Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin an der Universität Tübingen
ehem. Direktor: Professor Dr. Gg. Schmidt

Immunologische Untersuchungen zur Frage zellständiger Antikörper beim plötzlichen und unerwarteten Säuglingstod

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

ERNST RUTKOWSKI
aus Mielau

1969

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin an der Universität Tübingen
ehem. Direktor: Professor Dr. Gg. Schmidt

Immunologische Untersuchungen zur Frage zellständiger Antikörper beim plötzlichen und unerwarteten Säuglingstod

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

ERNST RUTKOWSKI
aus Mielau

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. W. Graumann
Berichterstatter: Professor Dr. Gg. Schmidt

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung und Begriffsbestimmung	S. 1
II.	Kurzer Überblick zur Ätiopathogenese des plötzlichen und unerwarteten Säuglingstodes	S. 3
II.1.	Infektionen	S. 3
II.2.	Hypogammaglobulinämien	S. 5
II.3.	Synkopen und Reflexmechanismen	S. 6
II.4.	Status thymico-lymphaticus	S. 6
II.4.1.	Mechanischer Thymustod	S. 7
II.4.2.	Funktioneller Thymustod	S. 7
II.5.	Allergie	S. 8
III.	Immunologische Verhältnisse im Säuglingsalter	S. 11
III.1.	Immunologische Grundbegriffe	S. 11
III.1.1.	Antikörper	S. 11
III.1.2.	Antigen	S. 12
III.1.3.	Mechanismus der Antikörperbildung	S. 13
III.1.4.	Antigen-Antikörper-Reaktion und ihre Folgen	S. 15
III.1.5.	Virusinfektion	S. 17
III.2.	Zelluläre Abwehr	S. 17
III.3.	Humorale Abwehr	S. 17
IV.	Kurzer Überblick bisheriger Beobachtungen der immunologischen Funktionen des Thymus	S. 19
V.	Eigene immunologische Untersuchungen	S. 24
V.1.	Untersuchungen an menschlichen Thymusdrüsen	S. 24

V.2.	Versuche zur Präzipitation spezifischer Immunglobuline im Thymus gegen Kuhmilchproteine	S. 27
V.2.1.	Ergebnisse	S. 30
V.3.	Immunisierungsversuche mit Kuhmilch an Kaninchen	S. 31
V.4.	Versuche zur Präzipitation allgemeiner Immunglobuline im Thymus	S. 33
V.4.1.	mit Agargel	S. 33
V.4.1.1.	Ergebnisse	S. 35
V.4.2.	Präzipitationsversuche mit Immunfluoreszenz	S. 36
V.4.2.1.	Immunfluoreszenztechnik	S. 38
V.4.2.2.	Ergebnisse	S. 40
VI.	Diskussion	S. 43
VII.	Zusammenfassung	S. 47
VIII.	Literaturverzeichnis	S. 49

I. Einleitung und Begriffsbestimmung

Der "plötzliche und unerwartete Tod" im Säuglings- und Kindesalter ist weder klinisch noch pathologisch-anatomisch befriedigend definiert; seine Ätiologie und Pathogenese sind weitgehend ungeklärt.

Aus gerichtsmedizinischer Sicht reiht WEYRICH (1933) "jene Fälle als 'plötzlichen Tod' ein, bei welchen der Tod aus vermeintlich vollster Gesundheit oder nach geringfügigen, nicht ärztlich behandelten Krankheitserscheinungen plötzlich und unerwartet eingetreten war."

Abzulehnen ist wohl die Begriffsbestimmung nach GANGHOFNER (1902), der nur jene Todesfälle zugrunde liegen, die bei der Sektion keine Organveränderungen zeigten, die den plötzlichen Tod genügend erklären; GRUENWALD und JAKOBI (1951) schließen die Fälle mit gesicherten pathologisch-anatomischen Todesursachen aus. MÜLLER (1963) weist eine derartige Abgrenzung zurück, weil die Auffindungssituation und die Anamnese für den Begriff des 'plötzlichen Todes' maßgebend sein sollen; denn es soll untersucht werden, welche Befunde sich hinter dem unerwarteten Ereignis verbergen und nicht, welche ungeklärten Fälle bei Kindersektionen unter dem Bild des plötzlichen Todes auftreten.

Eine befriedigende Definition gibt MASSHOFF (1957): "Der Begriff 'plötzlicher Tod' ist für das Säuglings- und Kindesalter nicht so eng zu fassen, daß darunter nur der momentan aus völliger Gesundheit eingetretene Tod zu verstehen ist, sondern er ist zu erweitern auf jeden Tod, dessen Eintritt unerwartet, d. h. aus dem vorangegangenen Geschehen nicht befriedigend erklärbar erscheint."

Im anglo-amerikanischen Schrifttum gilt die Definition nach ADELSON und KINNEY (1956): "The death of a child who

was thought to be in good health or whose terminal illness appeared to be so mild that the possibility of a fatal outcome was not anticipated."

Eine Einordnung der kindlichen Todesfälle wird von einer genauen Anamnese abhängig sein. Sie wird aber weitgehend von der Fähigkeit der befragten Angehörigen bestimmt sein, Krankheitssymptome und Änderungen in der Verhaltensweise ihres Kindes wahrzunehmen.

Aufgabe dieser Arbeit wird es sein, hauptsächlich die immunologischen Verhältnisse und im besonderen die funktionelle Stellung des Thymus im Immunitätssystem zu schildern. Eigene fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen am Thymusgewebe plötzlich verstorbener Säuglinge und verunglückter Kleinkinder sollen zur Aussage über zellständige Antikörper herangezogen werden.

II. Kurzer Überblick zur Ätiopathogenese des plötzlichen und unerwarteten Säuglingstodes

Im Schrifttum sind die Todesursachenstatistiken der meisten Autoren nach Organerkrankungen geordnet. Neben gesicherten Ursachen enthalten sie zahlreiche Befunde, die genügenden Anlaß zu Hypothesen über die Ätiopathogenese des plötzlichen und unerwarteten Säuglingstodes bieten.

II.1. Infektionen

Die Häufung des plötzlichen Säuglingstodes in den Winter- und Frühjahrsmonaten (DAVISON 1945, JACOBSEN und VOIGT 1956, STOWENS 1957, SPANN 1959, MÜLLER 1962, MAHNKE 1966) und die im Vordergrund stehenden Infektionen des Respirationstraktes (RICHTER 50,6 % (1902), SIWE 55,9 % (1934), GARSCHE 82 % (1949), MAHNKE 48,2 % (1966)) werden von den meisten Autoren in epidemiologische Beziehung zu den in diesen Jahreszeiten gehäuft auftretenden Infekten gesetzt, obwohl enterale Infektionen bei HOEDT und PFEIFER (1966), Elektrolytentgleisungen mit sogenanntem Magen-Darm-Katarrh bei MARESCH (1961) und die Otitis media (occulta), der meistens eine aufsteigende Infektion aus dem Nasen-Rachen-Mundraum zugrunde liegt, bei WÖCKEL und RAUE (1961), GLOOR, NEF und ZOLLINGER (1961) als Todesursachen dominieren. Der Anteil nichtinfektiöser Erkrankungen als Ursache des plötzlichen Todes ist nach den Statistiken der meisten Autoren gering.

Bei der Beurteilung des pathologisch-anatomischen Substrates muß zwischen finalen und den der Grundkrankheit zugrunde liegenden Organveränderungen unterschieden werden (GARROW und WERNE 1953, ADELSON und KINNEY 1956).

Am Respirationstrakt prominieren als pathologische Veränderungen Bronchitiden, Bronchiolitiden, Peribronchio-

litiden, Pneumonien mit Rhinitiden, Pharyngitiden oder Laryngitiden und am Magen-Darm-Trakt hauptsächlich Enterokolitiden; sie vermögen wegen ihres häufig geringfügigen Befundes den plötzlichen Tod nicht genügend ursächlich zu erklären (GARROW und WERNE 1953).

Ausgedehnte Follikelkaryoklasien und Nekrosen des lymphatischen Systems mit geringen Infektzeichen der Atemwege fand MÜLLER (1963) bei 49 von 98 unerwartet verstorbener Kinder. Im Vergleich zu 582 von ihm überprüften Sektionen an Erwachsenen interpretiert er diese Befunde als das charakteristische morphische Substrat für den plötzlichen Tod im Säuglingsalter. (Ähnlich ADELSON und KINNEY 1956, GLOOR, NEF und ZOLLINGER 1961)

Die Suche nach einem ätiologisch verantwortlichen Keim für die morphische Reaktivität blieb bei den MÜLLERschen Untersuchungen unbefriedigt; denn die angelegten Kulturen von Sektionsorganen wiesen verschiedene pathogene Keime auf. Die von HOEDT und PFEIFER (1966) veröffentlichten bakteriologischen Befunde sind mit Zurückhaltung zu interpretieren, weil Kontrolluntersuchungen fehlen. CAMERON und ASHER (1965) fanden keine signifikanten Unterschiede an Kulturen des Respirationstraktes bei Kindern mit unbekannter und gesicherter Todesursache.

MÜLLER (1963) konnte an virusinfizierten jungen Mäusen die toxischen Alterationen der Follikel auslösen, die er bei den unerwartet verstorbenen Säuglingen und Kleinkindern in 50 % der Sektionen fand. Es gelang ihm auch, Relationen zwischen dem lymphatischen System und der Nebennierenrinde zu finden und sie in Bezug zum Geschehen des plötzlichen Todes zu setzen:

1. Milz, Lymphknoten und Thymus der virusinfizierten Mäuse zeigten unterschiedlich starken Kernzerfall der Lymphozyten; die Nebennierenrinde war auf der Höhe der karyoklastischen Krise weitgehend von

Lipiden entblößt.

2. An adrenalektomierten, mit Influenzavirus A infizierten Tieren konnten keine karyoklastischen Krisen des lymphatischen Systems ausgelöst werden.
3. Flammenphotometrisch konnte an Herz- und Skelettmuskulatur eine relative Kalziumabnahme nur bei nicht adrenalektomierten infizierten Mäusen nachgewiesen werden.

Diese tierexperimentellen Ergebnisse veranlassen MÜLLER, eine Virusinfektion als auslösende Todesursache bei plötzlich verstorbenen Säuglingen anzunehmen. Diese Infektion wird von ihm als Stress gedeutet, der mit Entblößung der Nebennierenrinde von Lipiden und mit Lymphozytolyse und Elektrolytverschiebungen einhergeht. Allerdings konnten bis jetzt nur in wenigen Fällen Viren isoliert werden (GOLD in 12 von 48 (1961), CAMERON und ASHER in 1 von 172 Fällen (1965)).

Bakterielle, virale, chemische und physikalische Reize wirken als Stress auf das Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-System; unbekannt ist jedoch, welche Bedeutung der Lymphozytolyse dabei zuzumessen ist. Eine ausgesprochene Empfindlichkeit der Säuglinge gegen Virusinfektionen könnte durch die ungenügend ausgebildete zelluläre Abwehr erklärt werden, obwohl das Neugeborene durch diaplacentar übertragene Antikörper für einige Monate eine "Leihimmunität" erhält.

II.2. Hypogammaglobulinämie

JANEWAY, APT und GITLIN (1953) entdeckten die Hypogammaglobulinämie, zu der sich inzwischen Formen von Agammaglobulinämien hinzugesellt haben. SPAIN, BREDESS und GREENBLATT (1954) untersuchten Seren dreier plötzlich verstorbener Säuglinge; sie fanden dabei erniedrigte Gammaglobulinwerte. CAMERON und ASHER (1965) hingegen fanden normale Werte, in einigen Fällen sogar ge-

ringgradige Hypergammaglobulinämien.

1960 bestimmte MARESCH tonometrisch Kalzium und Kalium im Herzmuskel plötzlich verstorbener Kinder, die einen Magen-Darm-Katarrh aufwiesen. Er fand eine signifikante Kalziumverminderung mit relativ konstanten Kaliumwerten. Im Gegensatz zu MÜLLER (1963) hält er die Elektrolytverschiebungen nicht für ausschließliche Folgen einer Virusinfektion.

II.3. Synkopen und Reflexmechanismen

Der blitzartige Tod von Kindern in der Synkope nach geringfügigen äußeren Einwirkungen, zum Beispiel Eintauchen in kaltes Wasser, Kehlkopfinspektionen, ist in der Literatur beschrieben (SCHLEYER 1965). Er wird als Folge pathologischer Vagusreizung mit reflektorischem Letalausgang gedeutet.

II.4. Status thymico-lymphaticus

1889 prägte PALTAUF den Begriff des Status thymico-lymphaticus, den er für eine Konstitutionsanomalie hielt, die zum plötzlichen Tod prädisponiere und charakterisiert werde durch "Vergrößerung der Tonsillen, ausgebreitete Lymphdrüsenkomplexe, Vergrößerung der Milz und endlich durch Vorhandensein einer verschieden großen Thymusdrüse, zu einer Zeit, in der diese sonst schon ganz geschwunden zu sein pflegt." Schon die Uneinigkeit über die normalen Durchschnittsgewichte des individuell großen Schwankungen unterworfenen Thymus macht die Diagnose einer "Thymushyperplasie" schwierig, hinzu kommt noch die Unklarheit über das entscheidende morphische Substrat der Hyperplasie (HAMMAR 1909).

In der älteren Literatur wird die Thymushyperplasie häufig kritiklos bei sonst negativem Sektionsbefund als Ursache eines plötzlichen Todes beschuldigt. Entsprechend den Auffassungen der Autoren kann man einen mechanischen von einem funktionellen Thymustod trennen.

II.4.1. Mechanischer Thymustod

1614 beschrieb PLATER bei einem vier Monate alten Säugling den mechanischen Tod durch eine geburtstraumatische Blutung in den Thymus. REHN meinte, ein hyperplastischer Thymus fülle den Thorax "fast vollständig" aus. WIESEL war der Ansicht, daß die Trachea beim Rückwärtsbeugen des Kopfes komprimiert werde und eine Hyperämie sogar zum Erstickungstod führen könnte.

Beim Neugeborenen sind jedoch zur Lichtungseinengung der Trachea nach GUNDOBIN 230 - 260 g erforderlich. Zur Kompression der Trachea wäre bei einem 1jährigen Kinde ein Gewicht von 700 g nötig.

II.4.2. Funktioneller Thymustod

Einen solchen nahm PALTAUF bei Kindern und Jugendlichen im Status thymico-lymphaticus an. Seitdem beschuldigte eine große Anzahl Autoren ihn als Ursache plötzlichen Todes aus scheinbar voller Gesundheit. Er wurde einfach als Herztod aufgefaßt. PALTAUF dachte dabei an Herzkammerflimmern, ZONDEK vermutete eine plötzliche Elektrolytverschiebung im Herzmuskel, MORO sprach von einem reflexogenen Geschehen, WIESEL beschuldigte ein im Thymus produziertes Hormon.

Nach HAMMAR aber ist die Thymushyperplasie vielleicht eine sekundäre Erscheinung bei häufig unbekanntem Grundleiden. "Nicht der große Thymus ist die Ursache des Todes, sondern der Thymus war groß, als der Tod plötzlich eintrat" (zit. n. TESSERAUX).

Unmißverständlich lehnen heute nahezu alle Autoren den Thymustod als mechanischen oder funktionellen ab. ROMINGER schreibt 1961, daß selten ein hundertfach widerlegter Begriff so erstaunliche Auferstehungen in stets neuen Gewändern erfahren habe. Im anglo-amerikanischen Schrifttum wird der Status thymico-lymphaticus als prädisponierendes Moment für den plötzlichen Tod abgelehnt (VALDES-

DAPENA 1967).

II.5. Allergie

BARRETT inaugurierte 1954 ein Allergiegeschehen als mögliche Ursache des plötzlichen Todes im Kindesalter. Es besteht darin, daß Säuglinge aus dem Verdauungstrakt ungenügend abgebaute Kuhmilch absorbieren können und gegen ihre Proteine humorale Antikörper bilden können, die bei einigen Ursache einer Hypersensibilität sind. Da angeblich Säuglinge auch während des Schlafes Mageninhalt regurgitieren und diesen in den Respirationstrakt aspirieren können, wäre eine anaphylaktische Reaktion mit letalem Ausgang möglich (PARISH, BARRETT, COOMBS, GUNTHER und CAMPS 1960).

GUNTHER, ASCHAFFENBURG, MATTHEWS, PARISH und COOMBS (1960) wiesen mit der von ihnen modifizierten indirekten Hämagglutinationsmethode nach Boyden bei 286 normalen, unauffälligen Kindern im Alter von 7 bis 97 Wochen in 64 Fällen humorale Antikörper gegen Kuhmilchproteine nach. 1962 konnten GUNTHER, CHEEK, MATTHEWS und COOMBS mit derselben Methode bei 108 gesunden Säuglingen mit bekannter Ernährungsanamnese in 46 Fällen geringe Antikörpertiter feststellen. Die untersuchten Blutproben stammten aus Fersenpunktionen 6 bis 13 Tage alter Säuglinge.

1964 wurde diese Hypothese der anaphylaktischen Reaktion als potentielle Ursache des unerwarteten Todesgeschehens im Säuglingsalter serologisch, pathologisch-anatomisch und lungenphysikalisch geprüft. Außerdem versuchten PARISH, RICHARDS, FRANCE und COOMBS im Tierversuch die anaphylaktischen Reaktionen an Meerschweinchen zu reproduzieren:

1. Der Antikörpertiter gegen das gesamte und partielle Proteinspektrum der Kuhmilch war bei 38 plötzlich verstorbenen Kindern mit einer detaillierten Anamnese

im Vergleich zu solchen mit gesicherter Todesursache bis auf wenige Ausnahmen wesentlich erhöht.

2. Die intradermalen Injektionen mit Seren plötzlich verstorbener und gesunder Säuglinge, die gegen Kuhmilchproteine spezifische Immunglobuline synthetisiert hatten, führten zu keinen überzeugenden anaphylaktischen Reaktionen an der präparierten Meerschweinchenhaut.
3. Der serologische Nachweis von Kuhmilchproteinen mit der Agargeldiffusionsmethodik nach OUCHTERLONY in den Lungen 60 unerwartet verstorbener Kinder gelang in 25 Fällen, in Kontrollexperimenten mit 25 an kongenitalen Abnormitäten verstorbener Kinder in 8 Fällen.
4. Im Gegensatz zu 119 Blutproben gesunder Kinder konnten im postmortalem Herz- und Venenblut in 18 von 111 unerwartet verstorbener Säuglinge ß-Lactoglobulin, α-Lactalbumin und Casein nachgewiesen werden.
   Diese Befunde deuten auf ein prämortales Geschehen mit Übertritt der Proteine aus der Lunge in den Kreislauf. Das führt zur Spekulation einer anaphylaktischen Reaktion im gesamten Kreislauf und zum Ausschluß der Lunge als alleiniges Schockorgan. Dabei bleibt aber die ungenügende oder fehlende Neutralisation der humoralen Antikörper mit den Kuhmilchproteinen ungeklärt.
5. Die mikroskopisch morphischen Lungenveränderungen plötzlich verstorbener Säuglinge ließen sich im Tierexperiment reproduzieren. Meerschweinchen wurden mit Kuhmilch sensibilisiert und mit Pentobarbital leicht anästhesiert, um ein dem kindlichen Schlaf entsprechendes Analogon zu schaffen. In diesem Zustand erhielten die Tiere in ihren Kehlkopf wenige Tropfen vom Mageninhalt plötzlich verstorbener Kinder; nach kurzer Zeit starben die Meerschweinchen ohne Krämpfe.
6. Die Bronchialkonstriktionen werden als ein morphisches Substrat eines allergischen Geschehens gewertet. Aus

diesem Grunde wurden 6 Lungen plötzlich verstorbener Kinder mit einer gepufferten physiologischen Kochsalzlösung konstanten Druckes perfundiert. Signifikante Ergebnisse konnten nur im Tierversuch erzielt werden.

7. Die Aktivitätsbestimmung der Mediatoren, die beim anaphylaktischen Schock freiwerden, wird durch postmortale unspezifische Reaktionen verfälscht.
8. Im anaphylaktischen Schock der Meerschweinchen wird ein eosinophiler Faktor frei. In Analogie hierzu wurde Lungengewebe plötzlich verstorbener Kinder in Diffusionskammern gebracht und in die Peritonealhöhle der vorbehandelten Meerschweinchen implantiert. Die Existenz dieses eosinophilen Faktors konnte nicht bestätigt werden.

Die Hypothese einer Kuhmilchallergie mit letalem Ausgang setzt die Aspiration regurgitierten Mageninhaltes voraus; inwieweit sie zutrifft, ist noch unentschieden, denn gesunde und leicht kranke Kinder aspirieren sehr selten Erbrochenes (GARSCHE 1949, WÖCKEL und RAUE 1961).

Auch die Frage nach der jahreszeitlichen Abhängigkeit und der Epidemiologie des plötzlichen Todes läßt sich nicht beantworten.

Die morphischen Lungenveränderungen interpretiert MÜLLER (1963) lediglich als Zeichen eines plötzlichen Todes, die ebenso bei einer anaphylaktischen Reaktion mit letalem Ausgang vorhanden sein können.

III. Immunologische Verhältnisse im Säuglingsalter

Das Verständnis der Immunität im Säuglingsalter und die kritische Beurteilung eigener fluoreszenzimmunologischer Ergebnisse setzen die Darstellung einiger Grundbegriffe aus der Immunologie voraus, der hauptsächlich Übersichtsarbeiten von GRABAR (1961), GÜNTHER (1966), MERLER und ROSEN (1966) zugrunde liegen.

III.1. Immunologische Grundbegriffe

Die Immunität ist ein komplexes Geschehen. Die Abwehr erfolgt an Körpereintrittspforten und an Körperoberflächen vorwiegend unspezifisch, in der Tiefe hauptsächlich spezifisch durch besondere Körperzellen. Die Phagocytose hauptsächlich der Mikroben und fremder Substanzen leitet die spezifische Abwehr ein.

III.1.1. Antikörper

Sein allgemeingültiges Charakteristikum ist seine Fähigkeit, sich mit dem Antig en, das seine Bildung hervorgerufen hat, spezifisch zu vereinen. Antikörper sind Proteine, die durch halbgesättigte Ammoniumsulfatlösungen ausgefällt und daher als Globuline bezeichnet werden. Bei der papierelektrophoretischen Auftrennung des menschlichen Serums wandern sie in der Gammaglobulinfraktion. Immunelektrophoretisch unterscheidet man heute hauptsächlich drei Gammaglobulinklassen: IG G, IG A und IG M. Die Analyse isolierter Immunglobuline mit Fermenten, die hauptsächlich Wasserstoffbrücken lösen, erlaubte Einblicke in ihre molekulare Struktur: Jedes vollständige Immunglobulin besteht aus mindestens 4 Strukturelementen: je 2 L- und H-Peptidketten, die durch Disulfid- oder Wasserstoffbrücken miteinander verknüpft sind. Träger der Antigendeterminanten sind die H-Ketten (FLEISCHMANN, PORTER und PRESS 1963). Das Globulinmolekül erscheint auf Grund von

Röntgen-Kleinwinkel-Analysen als eine zylindrische Walze (EDELMAN und GALLY 1964).

HARRIS und HARRIS (1956) postulieren als Ort der Antikörperbildung die Lymphozyten. Homogene Zellaufschwemmungen aus der Milz, dem Lymphknoten und dem Ductus thoracicus von Lymphozyten immunisierter Tiere bilden bei Antigenkontakt Antikörper; dabei erfahren die Lymphozyten eine morphische Umwandlung, deren Form an Plasmazellen erinnert. Ergebnisse autoradiologischer Untersuchungen an markierten Chromosomen (BRAUNSTEINER, HÖFER und SAILER 1961, HITZIG 1963) und die Umwandlung transferierter Lymphozyten aus immunisierten in röntgenbestrahlten Mäusen in Plasmazellen mit nachweisbaren spezifischen Immunglobulinen demonstrieren die immunologische Kompetenz der Lymphozyten (HARRIS und HARRIS 1954, HARRIS 1965). Die Blutlymphozyten rezirkulieren in das Lymphgefäßsystem (GOWANS 1958); vielleicht wirken sie dabei als Träger immunologischer Informationen (HITZIG 1963).

Die Verfechter der Plasmazellentheorie führen ins Feld (GRABAR 1961):
a) Die Synthese der Proteine vollzieht sich mit Hilfe der Ribonucleinsäuren; die Plasmazellen besitzen im Gegensatz zu Lymphozyten ein üppiges, an Nucleinsäuren reiches, elektronenoptisch darstellbares Ergastoplasma, so daß sie a priori eher dazu befähigt sind, Proteine zu bilden.
b) Die Plasmazellen fehlen fast vollständig bei Patienten mit Agammaglobulinämie, während die Lymphozyten zumeist in normaler Zahl vorhanden sind (BRAUNSTEINER 1964).

In Anbetracht vielfältiger Befunde und vor allem der Ergebnisse der neueren Thymusforschung sprechen BURNET (1962, 1965) und andere Autoren allgemein von immunologisch kompetenten Zellen.

III.1.2. Antigen

Als "Antigene" bezeichnet man Substanzen, die im lebenden

Organismus die Bildung spezifischer Antikörper hervorrufen und sich mit ihnen spezifisch verbinden. Als "Hapten" werden Stoffe definiert, die zwar ohne Bindung an ein Protein in der Regel keine Antikörper bilden, sich aber mit ihnen in vitro spezifisch vereinigen.

Die Molekülgröße einer fremd erkannten Substanz allein ist keine ausreichende und notwendige Voraussetzung für ihren Antigencharakter. Makromolekulare Stoffe begünstigen zwar die Antigenität, aber LANDSTEINER hat darauf hingewiesen, daß kleine Moleküle, wenn sie auf Gewebsbestandteilen haften, die Bildung spezifischer Antikörper anregen. Eine antigene Substanz muß nicht notwendigerweise ihrer chemischen Natur nach Proteincharakter besitzen.

Exogener Ursprung der Antigene ist keine unabdingbare Forderung; denn auch körpereigene Substanzen können als fremd erkannt werden und Immunglobulinproduktion hervorrufen.

LANDSTEINER demonstrierte an künstlichen Antigenen ihre Spezifität: sie ist durch die räumliche Konfiguration einzelner Gruppen im Molekül bedingt und wird als "Antigendeterminante" bezeichnet. "Gekreuzte Reaktionen" verschiedener Substanzen mit einheitlichen Antikörpern finden daher ihre Erklärung im gemeinsamen Besitz identischer Determinanten.

III.1.3. Mechanismus der Antikörperbildung

Die Vorgänge von der Anwesenheit der antigenen Moleküle in Phagocyten bis zur Antikörperbildung in immunologisch kompetenten Zellen sind wenig bekannt. Bisherige Befunde gaben Anlaß zu verschiedenen Hypothesen:

a) Fremde Substanzen werden gespalten; noch antigen wirkende Spaltprodukte konnten im Zellinnern von GARVEY und CAMPBELL nachgewiesen werden. Welcher Faktor einer vollständigen Spaltung Einhalt gebietet, damit die "Trümmer" noch die Spezifität der verabreichten Antigene besitzen, ist unbekannt.

b) Die Hypothesen müssen auch die Latenzzeit zwischen der Erstinjektion eines Antigens und den dann zuerst nachweisbaren Antikörpern im Serum, ihrer kurzdauernden Verminderung nach späterer Zweitinjektion mit nachfolgender rascher Zunahme erklären können.
c) Die Antigenmengen und der Charakter einer antigenen Substanz sind für die Induktion der Immunglobulinsynthese bedeutend: sie können zur Immunparalyse oder erworbener Immuntoleranz führen.
d) Die Antikörperbildung ist mit dem allgemeinen Proteinstoffwechsel verknüpft, daher muß eine Hypothese die Beziehung der Nucleinsäuren der Zelle zur Proteinsynthese berücksichtigen.

Die Seitenketten-Theorie (PAUL EHRLICH) besagt, daß die Körperzellen zu allen möglichen Antigenen komplementäre Seitenketten aufweisen, die betreffende Antigene binden können. Überschußregenerate von Seitenketten erscheinen im Serum als Antikörper.

Bei der Matritzen-Theorie (PAULING) dient die Antigendeterminante als Muster, anhand dessen die vorher synthetisierten Peptidketten in eine zum Antigen komplementäre, d. h. spezifisch sterische Struktur umgefaltet werden.

Die Klon-Selektions-Theorie (BURNET 1959) besagt, daß die lymphoide Zelle mit genetisch fixierten immunologischen Mustern begabt sei. Während des Kontaktes des eingedrungenen Antigens mit den different determinierten "Schablonen" werde eine mit komplementärer Entsprechung zum Antigen ausgewählt. Der antigene Stimulus bewirke dann eine Multiplikation dieser Zelle.

Ob für die große Anzahl künstlicher Antigene tatsächlich genetisch fixierte komplementäre Schablonen vorhanden sind, ist fraglich. Die Vererbung spezifischer Antikörperbildungsfähigkeit von Mutter- auf Tochterzellen stößt

auf Kritik, weil ein immunisierter Körper ununterbrochen Immunglobuline bilden würde; das entspricht nicht der Wirklichkeit (GRABAR 1961).

Nach HAUROWITZ (1965) greift das Antigen bereits in den Synthesemechanismus der Peptidketten ein; die unterschiedliche Spezifität ist bereits in der Primärstruktur, d. h. in der Aminosäuresequenz verankert. Diese Hypothese steht im Einklang mit experimentellen Befunden der H-Ketten als Träger der Antigendeterminanten.

III.1.4. Antigen-Antikörper-Reaktion und ihre Folgen

Es wird heute angenommen, daß die Antikörper in ihrer Molekularstruktur komplementäre Gebilde zum Antigen besitzen; die Antigenspezifität ist durch eine räumlich strukturelle Anordnung bedingt.

Der Antigen-Antikörperbindung liegen elektrostatische Kräfte. van der Waals-sche Kräfte zugrunde; Disulfidbindungen und Wasserstoffbrücken werden häufig gefunden.

In vitro kann die AG-AK-Vereinigung durch Präzipitation oder Agglutination und Zytolyse demonstriert werden.

HEIDELBERGER und MARRACK erklären die Präzipitation als Folge einer Vereinigung reziproker multivalenter Antigene mit Antikörpern. Nach GRABAR erfolgt ein Ausfall, wenn die Wasserlöslichkeit der reagierenden Moleküle infolge ihrer Vereinigung soweit abfällt, daß die noch freien polaren Gruppen sie nicht mehr aufrechterhalten können. Elektrolytgehalt, pH-Verschiebungen und unterschiedliche Konzentrationen der reagierenden Substanzen beeinflussen die Präzipitation.

In vivo kann die Vereinigung von Antigen und Antikörper einen Schutz oder unheilvolle Wirkungen verursachen. Zum Beispiel demonstriert die Neutralisation der Tetanus- oder Diphtherietoxine durch spezifische Antikörper sinnfällig schützende Reaktionen. Die Lyse der weißen und

roten Blutzellen zeigt dagegen das Unheil für den Organismus an.

1902 beobachteten PORTIER und RICHET bei Hunden, die sie in der Absicht zu immunisieren, ein zweites Mal dasselbe Antigen injizierten, den sofortigen Tod der Tiere. Sie prägten darum den Begriff der Anaphylaxie. 1906 schlug PIRQUET für die "veränderte Wirkungsweise des Organismus" gegen fremde Substanzen den Begriff "Allergie" vor.Heute wird er im Sinne einer Überempfindlichkeit, eines durch Antikörper bedingten Zustandes, verstanden.

Die zirkulierenden, eine Allergie auslösenden Antikörper werden"Reagine" genannt. Sie unterscheiden sich vom Immunantikörper durch ihre größere Thermolabilität und ihre Wanderung in der ß-Fraktion der papierelektrophoretischen Serumauftrennung. Der Nachweis der Reagine erfolgt leicht im Prausnitz-Küstner-Versuch. Die Auslösung einer passiven Anaphylaxie nach Injektion von antikörperhaltigem Serum, z. B. in die Haut eines Tieres, benötigt bis zu ihrer Manifestation eine bestimmte Latenzzeit. Daraus wird gefolgert, daß die Antikörper an Oberflächen bestimmter Zellen gebunden werden, um ein allergisches Geschehen ablaufen zu lassen (GRABAR 1961, KELLER 1967, SORKIN 1964).

Die allergischen Gewebsreaktionen lassen sich hauptsächlich in zwei Gruppen einteilen: Frühreaktion und verzögerte Reaktion. Anaphylaktische Zustände sind durch raschen Wirkungseintritt nach Antigengaben oder Injektion von antikörperhaltigem Serum charakterisiert.

Die verzögerte Allergie, hauptsächlich bei tuberkulinsensibilisierten Individuen beobachtet, ist mit Lymphozyten, mononucleären Zellen und beim Menschen auch mit Zellextrakt übertragbar (KELLER 1967).

"Immunität einerseits, Allergie und Anaphylaxie andererseits vertreten die Physiologie und Pathologie des Immunsystems." (GÜNTHER 1966)

III.1.5. Virusinfektion

Der Eintritt des Virus in eine empfängliche Zelle ist absolute Voraussetzung einer Virusinfektion. Dringen zwei Virusarten in die Zelle ein, so kann man feststellen, daß sich nur das eine Virus vermehrt. Dieses Phänomen bezeichnet man als "Interferenz" und interpretiert es als a) Zerstörung der Rezeptoren an der Zelloberfläche nach Kontakt mit einem Virus, b) als Konkurrenz der Virusarten um den Stoffwechselapparat der Zelle und c) durch zellreaktive Sekretion einer Substanz, Interferon, (ISAACS und LINDEMANN 1957) das benachbarte Zellen vor einer Virusinfektion schützt. Das Interferon ist ein Proteinkomplex, der über weitere Proteine unspezifisch die Virusvermehrung in der Zelle zu hemmen scheint (SIGEL 1966).

III.2. Zelluläre Abwehr

Die Rundzellen des Reticulo-histiocytären Systems scheinen die gemeinsame Basis verschiedener immunologischer Phänomene zu bilden, der verzögerten allergischen Reaktion, der Transplantationsimmunität und der Antigentoleranz (KELLER 1967, BREEN 1962).

III.3. Humorale Abwehr

Sie ist charakterisiert durch die Wirkung der Immunglobuline. Mehr oder weniger unspezifisch beteiligt sich das Komplement-Properdin-System an der humoralen Abwehr (HITZIG 1963).

Der IG G-Globulinspiegel des Neugeborenen entspricht mit 1,1 - 1,3 Gew. % weitgehend genau dem seiner Mutter. Im ersten Trimenon fällt er exponentiell auf ein Minimum von 0,4 - 0,6 Gew. % ab; von der 12. Woche nimmt er kontinuierlich zu, bis er mit 18-24 Monaten Erwachsenenwerte erreicht (v. MURALT 1966).

Der Gehalt an IG A-Globulinen des Nabelschnurblutes beträgt ungefähr 0,3 Gew.%, vom 20. Lebenstag steigt er an, mit 3 Jahren entspricht er dem Erwachsenenwert von 200 Gew.% (ROTH 1962, v. MURALT 1966).

Der IG M-Globulinwert des Neugeborenen liegt bei etwa 8 Gew.%, er steigt in den ersten 10 Lebenstagen rasch an und korrespondiert am Ende des 3. Lebensjahres mit dem des Erwachsenen (ROTH 1962, HITZIG 1961).

Die absoluten und relativen Werte der IG A- und IG M-Globuline verändern sich während der fetalen Entwicklung nicht oder nur geringfügig (v. MURALT 1966). IG G steigt kontinuierlich vom 4. Fötalmonat an und erreicht an termingerechter Geburt mütterliche Werte.

Der IG G-Globulingehalt des Neugeborenen entspricht weitgehend dem mütterlichen. Neugeborene einer agammaglobulinämischen Mutter besitzen kein IG G-Globulin (GOOD und ZAK 1956).

Der Übertritt der IG G-Globuline auf den Föten geschieht diaplacentar (BANGHAM 1960); die Placenta bildet zumindestens in vitro kein Gammaglobulin (DANCIS,BRAVERMAN und LIND 1957).

Neben der Graviditätsdauer beeinflußt der Antigenkontakt die immunologische Reifung des Säuglings. Selbst Frühgeborene können nach Impfungen mit größeren Antigenmengen Antikörper produzieren (RENTSCH, ROSSI, v.MURALT, WIESMANN 1961). Experimente an steril aufgezogenen Tieren zeigten die Abhängigkeit der Antikörperbildung von dem äußeren Antigenreiz. Die Globuline waren stark vermindert. Die nachweisbaren Antikörper sind Reaktionen auf Nahrungsantigene (WOSTMAN und GORDON 1958).

IV. Kurzer Überblick bisheriger Beobachtungen der immunologischen Funktionen des Thymus

Die Immunität des Individuums wird hauptsächlich als funktionelles Geschehen der immunologisch kompetenten Zellen betrachtet; deren Herkunft, Entwicklung und Reaktivität bestimmende Faktoren ihrer Funktionen sind. In diesem Zusammenhang wird dem Thymus eine zentrale Bedeutung zugesprochen.

Der Thymus des Säugers entwickelt sich aus dem Entoderm und Ektoderm der 3. und 4. Schlundtasche (MILLER 1964). Seine Lymphozyten entstammen dem Epithel, benötigen aber zu ihrer Entwicklung den induktiven Reizes des umgebenden Mesenchyms. AUERBACH (1961/64) konnte in Thymusrudimenten von Mäuseembryonen in vitro und nach Verpflanzung in die vordere Augenkammer normaler und bestrahlter Mäuse die Entwicklung der Lymphozyten demonstrieren und an Organkulturen die mesenchymale Induktion durch räumliche Trennung des Mesenchyms vom Epithel mit Milliporbarrieren nachweisen.

Im Cortex des Thymus befinden sich hauptsächlich kleine Lymphozyten und einige große, subcapsuläre, Perjodsäure-Schiff-positive Zellen (METCALF und ISHIDATE 1961); die Medulla wird durch die Hassallschen Körperchen - abgeplattete, konzentrisch angeordnete Epithelzellen - charakterisiert.

Bei der Geburt ist der Thymus das größte lymphatische Organ des Körpers (MILLER 1964). Während der ersten beiden Lebenswochen steigt bei Mäusen die Lymphozytenzahl auf etwa das 32fache an (AXELRAD und VAN DER GAAG 1962). Die lymphopoetische Aktivität ist 4 bis 10fach höher als die anderer lymphatischer Organe (METCALF 1962), der Umsatz an Desoxyribonucleinsäuren 2 bis 5 Mal so lebhaft wie in Lymphknoten (ANDREASEN und OTTESEN 1945).

Die Steuerung der Thymuslymphopoese ist unabhängig von Antigenreizen, partieller Thymusresektion, Thymusimplantation (METCALF 1963) und hormonalen Einflüssen. Wahrscheinlich erfolgt der Proliferationsreiz im Thymus selbst, vielleicht von den Perjodsäure-Schiff-positiven Riesenzellen; denn in ihrer Nähe liegen dicht gedrängte, teilweise in Mitose befindliche Lymphozyten (METCALF 1961).

LEBLOND und SAINTE-MARIE (1960) schließen aus Differentialzellzählungen und Analyse der mitotischen Indices in Rinde und Mark auf eine Diapedese der kleinen Lymphozyten aus dem Cortex via Medulla in den Blutkreislauf. MILLER (1964) fand bei neonatal thymektomierten Mäusen nach Transplantation eines mit Chromosomen-Marker-Technik gekennzeichneten Thymus Zellen in Milz und Lymphknoten, die dem Transplantat entstammten. Er deutet diesen Befund als einen artifiziellen Übertritt markierter Zellen in die Blutbahn, der durch den komplizierten Anschluß der Blutgefäße bedingt sein könnte. COWANS (1961) wies nach, daß der Thymus von der Rezirkulation der Blutlymphozyten ausgeschlossen ist. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß der direkte Beweis der Emigration der kleinen Lymphozyten aus dem Thymus noch immer fehlt (FORD 1966).

METCALF (1959) postuliert die Existenz eines humoralen, spezifisch Lymphozyten stimulierenden Faktors, mit dem er bei neugeborenen Mäusen eine vorübergehende Blutlymphozytose erzielte. MILLER (1964) gelang es, bei neonatal thymektomierten Tieren durch intraperitoneale Implantation von Thymusgewebe in Diffusionskammern ausgefallene Funktionen wiederherzustellen. Elektronenoptisch und radiographisch scheint nun auch der morphische Nachweis eines Sekretionsmechanismus der reticulo-epithelialen Zellen des Markes geglückt zu sein (CLARK 1966).

Die Reaktivität des Thymus, besonders seiner Lymphozyten, auf exogene und endogene Reize, der Funktionsausfall durch

Thymektomie und seine Substitution durch Thymusimplantation vermochten die immunologischen Funktionen des Thymus besser erkennen zu lassen. Gegen ionisierende Strahlen zeigt der Thymus eine unterschiedliche Sensibilität: sein lymphatischer Anteil wird mit 500 r vollständig zerstört, sein reticulo-epithelialer scheint bis zu 5000 r resistent zu sein (KALLMANN und KOHN 1955). Auch die Nebennierenrindenhormone wirken unterschiedlich auf den Thymus: Cortisol zeigt eine dosisabhängige Destruktion der kleinen Lymphozyten (DOUGHERTY, BERLINER und BERLINER 1962).

Antigenkontakt der Thymuslymphozyten führt weder zur Proliferation der Zellen (THORBECKE 1964) noch zur reaktiven Antikörperbildung im intakten Thymus immunisierter Tiere (HARRIS und HARRIS 1954).

In vitro zeigt das Thymusgewebe immunisierter Tiere nur geringe Aktivität zur spezifischen Antikörperproduktion. Die prinzipielle Fähigkeit scheint vorhanden zu sein; denn STONER und HALE (1955) gelang der Nachweis von spezifischen Antikörpern in Implantaten von Thymusgewebe in der vorderen Augenkammer bestrahlter Tiere.

Der fehlende Nachweis eines funktionierenden Phagocytosemechanismus und die elektronenoptisch nachgewiesene Thymus-Blut-Schranke (CLARK 1964) bedingen vielleicht die fehlende Antikörperbildung (MILLER 1964).

Thymektomie neonataler Mäuse führt zur Verarmung des gesamten Körpers an Lymphozyten; das lymphatische Gewebe ist nur noch mit wenigen Lymphozyten besiedelt und seine reticulo-epithelialen Zellen sind hyperplastisch. Die Antikörpersynthese kommt spät in Gang und ist nach Antigenkontakt deutlich erniedrigt (MILLER 1964). Die Transplantationsimmunität ist aufgehoben: Isologe, homologe und sogar heterologe Transplantate werden toleriert. Die an Zellen gebundene allergische Spätreaktion kann nicht nachgewiesen werden. Die noch vorhandenen lymphatischen Zellen besitzen

eine verminderte Fähigkeit, in Empfängertieren eine "graft versus host"-Reaktion (Antiwirt-Reaktion) auszulösen. Die Tiere sterben an einem Auszehrungssyndrom, dessen Ursache eine Infektion ist, die vom geschwächten Abwehrapparat nicht mehr beherrscht wird (MILLER 1964). Thymektomie mit subletaler Ganzkörperbestrahlung führt bei erwachsenen Mäusen zu einem dauernden Zusammenbruch aller Immunreaktionen; nach alleiniger Ganzkörperbestrahlung regenerieren die lymphatischen Gewebe und die immunologischen Funktionen erholen sich.

Restitution der Immunreaktionen beim neonatal thymektomierten Tier erfolgt auch durch homologe oder heterologe Thymustransplantate vollständig, ebenso nach intraperitonealer Einpflanzung in Diffusionskammern. Allerdings werden dabei die Transplantationsimmunität und andere zelluläre Immunreaktionen durch die Artspezifität des eingepflanzten Thymus geprägt (MILLER 1964).

Die"familiäre Lymphopenie", durch Alymphozytose und Agammaglobulinämie charakterisiert (HITZIG 1961), geht mit einer Thymusaplasie einher. Bei der Myasthenia gravis pseudoparalytica beobachtet man häufig eine Thymushyperplasie, die von BURNET als Autoimmunerkrankung gedeutet wird.

"Die experimentellen Befunde der letzten Jahre haben zwei Aspekte der biologischen Bedeutung des Thymus klar hervortreten lassen: seine Rolle als Schrittmacher im Aufbau und Wiederaufbau der lymphatischen Strukturen und seine innige Verflechtung mit den Immunreaktionen des Körpers. Auf welchen Wegen aber das Organ seine physiologischen Aufgaben erfüllt, ist ein immer noch offenes Problem."(MILLER 1964)

Bei den Vögeln ist die immunologische Reaktivität dissoziiert: der Thymus ermöglicht die Entwicklung der Transplantationsimmunität (WARNER und SZENBERG 1963); die Bursa Fabricii, ein lymphoepitheliales Organ im Bereich der Kloake, induziert die Antikörperbildung (WARNER undSZEN-

BERG 1963). Ähnlich wird die Entwicklung des Immunitätssystems anderer Tierspecies von zwei primär lymphatischen Organen gesteuert. Dabei erweist sich der Thymus ontogenetisch stets als frühestes Immunitätsorgan, in dem die ersten Lymphozyten des Organismus sichtbar werden (BLOCK 1963).

Offen bleibt, ob die nach Morphe und Funktion der Bursa Fabricii ähnlichen Organe des Kaninchens, z. B. die Appendix, und die Tonsillen des Menschen die Rolle der Bursa im Immunitätsgeschehen übernehmen (GOOD, GABRIELSEN, PETERSON, FINSTAD und COOPER 1966).

Unabdingbare Voraussetzung für die Abwehr eines Individuums gegen parenteral einverleibtes Zellmaterial ist die Erkennung als "fremd". BURNET (1962) spricht dem Thymus diese Funktion zu.

V. Eigene immunologische Untersuchungen

Aufgabe des experimentellen Teiles dieser Arbeit sind immunologische Untersuchungen an Lymphozyten des Thymus auf ihre potentielle antikörperproduzierende Fähigkeit, die sich in der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung zellständiger Antikörper erfassen ließe.

V.1. Untersuchungen an menschlichen Thymusdrüsen

Aus dem Sektionsmaterial des Institutes für gerichtliche Medizin an der Universität Tübingen untersuchten wir die Thymusdrüsen verstorbener Säuglinge, verunglückter Kinder und junger Erwachsener aus der Zeit von Januar 1967 bis September 1967.

Erst 1 bis 2 Stunden nach der Obduktion der Leichen konnten die Thymusdrüsen in einer Tiefkühltruhe (-21°C) bis zu ihrer Untersuchung aufbewahrt werden. Da die genaue Todeszeit der meist morgens tot im Bett aufgefundenen Säuglinge unbekannt ist, lassen sich keine exakten Liegezeiten der Leichen und vor allem auch der Thymusdrüsen bis zu ihrer Einfrierung angeben; auch die Umgebungstemperaturen sind unbekannt und werden voneinander differieren.

Untersuchte Thymusdrüsen:

SNr.: 18/67, IV/3/67, ♀ * 17.10.66 + 28.1.67
Vorgeschichte: Am 27.1.67 gegen 21.oo h letztmals gefüttert; nach 22.oo h sei das Kind unruhig geworden, habe geweint und Fencheltee bekommen. Morgens 7.3o h nächsten Tages sei es tot im Bett aufgefunden worden.
Path.-anatomisch: Lungenentzündung, plötzlicher Säuglingstod

SNr.: 52/67, IV/12/67, ♂ * 2o.1.67 + 4.4.67
Vorgeschichte: Mutter habe das Kind gegen 5.oo h gefüttert, gegen 7.45 h tot im Bett aufgefunden.
Path.-anatomisch: starke Lungenentzündung

SNr.: 60/67, I/5/67, ♂* 12.9.66 + 11.4.67
Vorgeschichte: Flächenhafte Hautwunden infolge vernachlässigter Pflege, Unterernährung.
Tod an allmählichem Kreislaufversagen

SNr.: 61/67, IV/13/67, ♂* 2.3.67 + 12.4.67
Vorgeschichte: Am 28.3.67 leichte Erkältung, 12.4.67 2.oo h letzte Nahrungsaufnahme, gegen 5.oo h tot im Körbchen aufgefunden.
Path.-anatomisch: nicht ausgedehnte interstitielle Pneumonie und Bronchialkatarrh

SNr.: 85/67, IV/18/67, ♂* 10.7.66 + 28.5.67
Vorgeschichte: Am 28.5. sei es munter gewesen, habe abends gegessen. Wenige Stunden nach Zubettgehen, sei es unruhig gewesen. Bald fand es der Vater puls- und atemlos.
Path.-anatomisch: Interstitielle Pneumonie und Enterokolitis hämorrhagica

SNr.: 156/67, IV/34/67, ♂* 22.12.66 + 19.8.67
Vorgeschichte: Kind tot im Bett aufgefunden.
Path.-anatomisch: Status thymicolymphaticus, Infekte der Atemwege, chronische Darmschleimhautentzündung

SNr.: 171/67, I/13/67, ♂* 11.11.66 + 19.9.67
Vorgeschichte: 17.oo h mit Herzstichen und Bauchschuß tot aufgefunden.

SNr.: 174/67, IV/40/67, ♂* 1.12.66 + 22.9.67
Vorgeschichte: Zeichen frischer Verbrennungen oder Verbrühungen am rechten Unterarm und an der rechten Brustseite, die zusammen weniger als 10 % der Körperoberfläche ausmachten.
Path.-anatomisch: gekürzt: Hirnödem, Lungenentzündung, Dünndarmschleimhautentzündung

SNr.: 176/67, I/14/67, ♂* und + 23.9.67
Vorgeschichte: Erwürgen

SNr.: 181/67, VII/6/67, ♂* und + 30.9.67
Vorgeschichte: Würgen und Knebeln des Kindes

SNr.: 67/67, IX/21/67, ♂* 5.9.55 + 21.4.67
Vorgeschichte: Autounfall
Path.-anatomisch: Lungenödem, Prellungsherde des Gehirns (gekürzt)

SNr.: 75/67, II/14/67, ♀ 12 Jahre
Vorgeschichte: E 605 - Vergiftung

SNr.: 120/67, IX/45/67, ♀ 6 Jahre
Vorgeschichte: Autounfall
Path.-anatomisch: Brustkorbquetschung mit Lungenzerreißung

SNr.: 162/67, II/59/67, ♀ 4 Jahre alt
Vorgeschichte: Unfall
Path.-anatomisch: Stumpfes Bauch- und Brusttrauma

SNr.: 163/67, IX/63/67, ♀ 3 Jahre alt
Vorgeschichte: Autounfall
Path.-anatomisch: Hirnödem (gekürzter Befund)

SNr.: 177/67, II/64/67, ♀ 8 Jahre alt
Vorgeschichte: Autounfall
Path.-anatomisch: stumpfes Brust- und Bauchtrauma

SNr.: 29/67, IX/7/67, ♂ 11 Jahre alt
Vorgeschichte: Autounfall
Schädelhirntrauma

SNr.: 40/67, V/5/67, ♀ 23 Jahre alt
Vorgeschichte: CO-Vergiftung durch Auspuffgase

SNr.: 48/67, III/7/67, ♂ 21 Jahre alt
Vorgeschichte: Selbsttötung durch Erstickung

SNr.: 124/67, IV/28/67, ♂ 38 Jahre alt (Thymus stark parenchymatös)
Vorgeschichte: Am 13.7.67 16.15 h tot aufgefunden. Tod an akutem Herzversagen durch funktionellen Verschluß der Kranzschlagadern.

V.2. Versuche zur Präzipitation spezifischer Immunglobuline im Thymus gegen Kuhmilchproteine

Die Nahrungsanamnese einiger plötzlich verstorbener und von uns sezierter Säuglinge und die von BARRETT (1954) inaugurierte anaphylaktische Reaktion auf Kuhmilchproteine als mögliche Ursache des plötzlichen Todes im Säuglingsalter veranlaßte uns, zunächst in einem Vorversuch eine Beteiligung des Thymus an der Produktion von Immunglobulinen zu testen.

Ein bohnengroßes Stück gefrorenen, nicht fixierten Thymus (SNr. 52/67 und 29/67) wurde mit einem Mörser zerrieben und mit 1 ml physiologischer NaCl-Lösung, die Cialit^{R} (Hoechst) in einer Verdünnung von 1:4000 enthielt, verdünnt. Pasteurisierte Kuhmilch wurde ebenfalls mit Cialit (0,4 mg/10 ml) versetzt und geometrisch von 1:10 bis 1:160 verdünnt.

2 g Reinagar (Behring) wurden in einer Mischung von 50 ml einer o,15 m Phosphatpufferlösung pH 7,1 und 15o ml Aqua dest. und einem Zusatz von 2o mg Cialit bis zur Bildung einer klaren Lösung erhitzt. 2 ml dieser heißen Flüssigkeit wurden auf 5 x 5 cm große Diagläschen mit einer Pipette aufgebracht. Nach dem Erstarren des Agars wurden mit einer Glaskapillare im Zentrum der Platte und im Abstand von 1 cm davon Löcher aus der Agarschicht herausgehoben. Gleichzeitig wurden 22 ml der heißen Lösung in 7,5 cm durchmessergroße Petrischalen gefüllt und nach dem Erstarren mit einem Glasbohrer Löcher von 0,6 cm Durchmesser in einem Abstand von 2 cm vom Mittelpunkt ausgestanzt und danach mit einem Tropfen heißer Agarlösung der Spalt zwischen Agargel und Glasboden abgedichtet.

Die zentrale Höhlung im Agargel wurde bis zum Rand mit dem vorbehandelten Thymusgewebsbrei gefüllt, die peripheren Löcher mit einer der verdünnten Kuhmilch. An-

schließend wurden die Platten und Petrischalen in einer feuchten Kammer bei 37°C 48 Stunden inkubiert.

Nach beendeter Diffusion wurde der Agargelfilm mit Chromatographiepapier bedeckt und bei Zimmertemperatur 18 bis 20 Stunden getrocknet, anschließend 3 Stunden in physiologischer NaCl-Lösung und weitere 3 Stunden in häufig gewechseltem destilliertem Wasser bis zur Eluierung der nichtpräzipitierten Proteine gewässert. Die Färbung der Präzipitationsmuster erfolgte 5 Minuten mit Amidoschwarz, das als Lösung (1 g Amidoschwarz 10 B, 1oo ml Eisessig, 7oo ml Methanol, 2oo ml Aqua dest.) präpariert war. Die Eliminierung des überflüssigen Farbstoffes und die Entfärbung des Agargelfilmes erfolgte in einem Methanol-Eisessig-Aqua dest. - Bad.

Die benutzte Gel-Diffusionsmethode für immunologische Analysen nach OUCHTERLONY (1958/62/65) beruht auf dem Prinzip der spezifischen Vereinigung des Antikörpers mit den Determinanten des Antigens; dieser physiko-chemische Vorgang zeigt sich in der Präzipitation, die durch das gelifizierte Milieu stabilisiert wird.

Die Grundlage der mathematischen Analyse der Diffusionsphänomene stellt das FOURIER'sche Gesetz dar, das als folgende Gleichung $1/K \times dV/dt = d^2V/dx^2 + d^2V/dy^2 + d^2V/dz^2$ für die Dreidimensionaldiffusion gültig ist. V bezeichnet die Eigenschaften der diffundierenden Substanzen zu der Zeit t und d die Distanz x, y, z. K ist eine Konstante, die die Diffusibilität einer Substanz in einem Medium wiedergibt (OUCHTERLONY 1958/62).

Die Form der Immunpräzipitation wird durch die immunologischen und physiko-chemischen Charakteristika der reagierenden Partner und durch die Form und Anordnung der Höhlungen (basins) bestimmt (OUCHTERLONY 1958/62):

Der Ort der Präzipitationslinie ist abhängig vom Diffusionsgradienten, den Diffusionskoeffizienten

(z.B. Form und Größe der Moleküle), der Löslichkeit der reagierenden Partner und der serologischen Verwandtschaft der diffundierenden Antigene,
die Dichte der Linie von der Gesamtmenge der Antigene und Antikörper am Orte der Präzipitation,
die Stabilität der Linie von einer ausgewogenen Konzentration (balanced system) des Immunsystems; ein Überschuß von Antigenen oder Antikörpern ist an der diffusen, nicht linienscharf gezogenen Präzipitation und dem Wachstum der Bande kenntlich.
Die Neigung (deviatio) der Präzipitationslinie wird verursacht durch die abnehmende Wanderungsrate der kritischen Konzentration eines Antigens im zentralen Teil.
Die vollständige oder partielle Verschmelzung (fusion) zweier Linien ist hauptsächlich abhängig von der serologischen Verwandtschaft der diffundierenden Antigene in einem Immunsystem.

Etablierte Präzipitationen können in einem Überschuß von Antigenen oder Antikörpern gelöst werden (Präzipitationskurven nach HEIDELBERGER).

Außerdem wirkt ein Präzipitat als spezifische Barriere für den Partner, der an der Präzipitation teilnimmt, für Reaktanten eines anderen Immunsystems lediglich als mechanische.

OUCHTERLONY klassifiziert die serologischen Reaktionen aus praktischen Belangen hauptsächlich in

1. einfaches Präzipitationssystem (simple precipitation system): Ein Antigen reagiert mit seinem korrespondierenden Antikörper.
2. multiples Präzipitationssystem (multiple precipitation system): Serologisch differente Antigene diffundieren im Agargel ihren korrespondierenden Antikörpern entgegen; es entsteht ein Präzipitationsmuster.

3. komplexes Präzipitationssystem (complex precipitation system): Serologisch verwandte Antigene werden gegen Antikörper gradueller Spezifität getestet.

Je nach Versuchsanordnung und Variation der die Form der Immunpräzipitation bestimmenden Größen lassen sich mannigfache Aussagen über serologische Eigenschaften der Antigene eines immunologischen Systems machen. Dabei ist in die Betrachtung und Auswertung eines solchen Systems die Möglichkeit bi- oder multivalenter Antigene wie Multivalenz der Antikörper (soweit sie hypothetisch gefordert wird) einzubeziehen.

Eine Agarkonzentration von 0,3 - 1,5 % interferiert mit der freien Diffusion der reagierenden Partner nicht; der Porendiameter beträgt z. B. bei 2 %iger Agarlösung 3 mμ (OUCHTERLONY 1962).

V.2.1. Ergebnisse

Alle Versuche mit Kuhmilch zeigten weder nach 24 noch nach 48 Stunden Präzipitationslinien.

Die Peripherie des zentralen, mit Thymusgewebsbrei gefüllten Loches wies einen etwa 2 1/2 mm breiten, diffus getrübten Hof im Agargel auf. Die Wandung und der Boden des ehemals gefüllten Loches waren mit fetzigen Gewebsrückständen unvollständig bedeckt.

Die peripheren, mit Milch verschiedener Verdünnung gefüllten Höhlungen erschienen leer, zeigten keine Rückstände; im Agargel war keine Trübung zu erkennen.

Die Ergebnisse auf den Diffusionsplatten unterschieden sich von denen mit Petrischalen sehr geringfügig.

Die Diffusion des Gewebsbreies im Agargel gegen ein Anti-Human-Serum aus der Ziege der Firma Hyland, Los Angeles, dokumentierte sich in 4 deutlichen, bogenförmigen, zum Teil scharflinigen, unterschiedlich breiten Präzipitationsbanden.

V.3. Immunisierungsversuche mit Kuhmilch an Kaninchen

Um den Ort der sessilen Antikörper cytologisch festzustellen, gingen wir von folgender Arbeitshypothese aus: Wenn spezifische Immunglobuline gegen Kuhmilchproteine an den Lymphozytenmembranen fixiert oder wenn die Lymphozyten selbst die antikörperproduzierenden Zellen sind, in denen die Antikörper vermutlich an den Mikrosomen lokalisiert sind, könne man mit einem fluoreszeinmarkierten Antikörper mit der Schichtenmethode nach COONS mikroskopisch die sessilen Immunglobuline unmittelbar nachweisen. Aus diesem Grunde wurden Kaninchen gegen Kuhmilch immunisiert; aus ihrem Serum sollte die Globulinfraktion ausgefällt und mit Fluoreszeinisothiocyanat markiert werden. Die Kuhmilchproteinantigene hielten wir für multivalent, die sich an einigen ihrer Valenzen mit dem Antikörper des Lymphozyten und an den restlichen mit den markierten, aus dem Kaninchenserum gewonnenen Immunglobulinen verbinden würden.

Es wurden 2 Kaninchen Nr. 693 Albino und Nr. 694 Feldhasengrau mit Kuhmilch hyperimmunisiert. Ihr Körpergewicht zu Beginn der Injektionen betrug (geschätzt) etwa 2 kg; das Futter enthielt auch frisches Gras.

Ein reines bzw. bekanntes Antigengemisch ist die ideale Voraussetzung für die Gewinnung eines relativ einheitlichen Antikörpers. Wir bemühten uns deshalb um eine keimarme frische Kuhmilch. Aus diesem Grunde wurde eine tierärztlich untersuchte Kuh angemolken und die weitere Milch in einem sterilen Gefäß aufgefangen, danach sofort in sterile Reagenzgläser in kleinere Portionen (15 ml) abgefüllt und etwa nach 1 Stunde in einer Tiefkühltruhe $-70^{\circ}C$ eingefroren. Eine Portion diente jeweils zur Keimauszählung. Von der Kuhmilch wurde eine geometrische Verdünnungsreihe von 1:1 bis $1:10^5$ unter sterilen Kautelen hergestellt. Danach wurde so bald wie möglich je 1 ml die-

ser Verdünnungen in jeweils 2 sterile Petrischalen pipettiert und dazu sofort 10 ml Gelatine-Agar (50-60°C) zugeschüttet und miteinander vermischt. Nach dem Erstarren des Agars wurden die Petrischalen 48 Stunden bei 22°C bebrütet. Die aus den Einzelkeimen entstandenen Kolonien wurden mit der Wolf-Hügel-Platte ausgezählt und der Keimgehalt pro ml Kuhmilch errechnet. Uns gelang es schließlich, eine keimarme Milch (170-200 und 300-400 Keime pro ml) für die Injektionen zu gewinnen.

Außerdem versuchten wir unter sterilen Kautelen die entrahmte Kuhmilch (5 min 3oooUpM) durch einen Salzfilter mit einem Druck von 5 - 6 atm N_2 zu filtern; der Versuch wurde abgebrochen, weil nur eine farblose Flüssigkeit abgepreßt wurde. Auch die Filtration im Steffi-Apparat mit einem Membranfilter unter einem Vakuum von 3ooo mm WS mißlang.

Im Abstand von 3 - 4 Tagen injizierten wir beiden Kaninchen intravenös steigende Mengen schnell aufgetauter Kuhmilch in die Ohrvene (0,1, 0,2 ml.... 0,6 ml). Nach der 6. Injektion entnahmen wir beiden Kaninchen 3,5 bzw. 1,5 ml Blut zur Titerbestimmung. Das Blut wurde zentrifugiert (1o min 3ooo UpM), das Serum abpipettiert und mit physiologischer NaCl-Lösung eine Verdünnungsreihe bis 1:40 hergestellt.

Die Titerbestimmung erfolgte mit unverdünntem Serum und mit fallenden Verdünnungen desselben; die Kuhmilch wurde bis auf 1:32 verdünnt. Wegen der geringen Menge des Kaninchenserums benutzten wir Capillarpipetten der Firma Hyland-Lab. und kleine Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von etwa 1 ml.

Eine Präzipitation konnten wir weder in den Capillarpipetten noch in den Röhrchen beobachten; darum entschlossen wir uns, die Injektionsmengen wesentlich bei unveränderten Injektionsabständen zu steigern (1, 2, 3, 5, 7, 9 ml).

Während der lezten Injektion zuckte der Albino mehrmals, wenige Sekunden später starb er unter Krämpfen.
Eine erneute Titerbestimmung ergab beim verstorbenen Al-

bino, der von der letzten Injektionsmenge nur 4 ml erhielt, eine Präzipitation bei einer Serumverdünnung 1:10 mit Kuhmilchverdünnungen von 1:8 bis 1:32, beim Kaninchen Feldhasengrau eine bei einer Serumverdünnung von 1:20 und fraglich bei 1:40 mit je einer Kuhmilchverdünnung von 1:8 bis 1:32. Wegen des niedrigen Titers wurden die Immunisierungsversuche eingestellt.

Vor jeder zur Injektion benutzten Kuhmilch-portion wurden 1 bis 2 Tropfen auf einer Blut- und Endoplatte ausgespatelt und 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Endoplatte zeigte bei allen Portionen keine einzige Kolonie; auf der Blutplatte waren punktförmige bis stecknadelkopfgroße, runde, gewölbte, porzellanweiße Kolonien in der Regel zu sehen, mitunter eine punktförmige mit einem grünen Hof. Im Präparat sahen wir grampositive Kokken, traubenförmig oder in Sarcine angeordnet oder einzelne ohne bestimmte Lagerung. Auf weitere Untersuchungen, z. B. Prüfung der Stoffwechselleistungen, verzichteten wir.

(Durch das freundliche Entgegenkommen des Direktors des Hygiene-Institutes, Tübingen, Herrn Prof.Dr.Bader, war es uns möglich, in seinem Institut die Kaninchen zu halten und zu immunisieren sowie die bakteriologischen Untersuchungen der Kuhmilch durchzuführen.)

V.4. Versuche zur Präzipitation allgemeiner Immunglobuline im Thymus

In einer dritten Versuchserie bemühten wir uns, den Ort der sessilen Antikörper der Lymphozyten des Thymus gemäß unserer Arbeitshypothese mit einem fluoreszeinmarkierten Serum zu lokalisieren.

V.4.1. mit Agargel

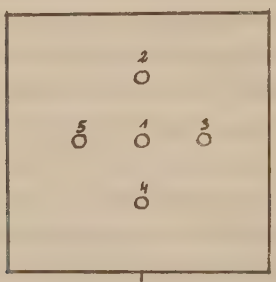
Zur Kontrolle der fluoreszenzimmunologischen Befunde und zur Testung des Thymus auf seinen Antikörpergehalt wählten wir die Geldiffusionsmethode nach OUCHTERLONY. Wir nahmen an, daß durch die mechanische Zerkleinerung des Thymusgewebes die hypothetisch vermuteten zellständigen

Antikörper in diffundabler Größe und Form frei werden.

Es wurden die auf den Seiten 24-26 erwähnten Thymusdrüsen untersucht. Ein bohnengroßes Stück gefrorenen, nicht fixierten Thymus wurde mit einem Mörser zerrieben.

Ein Anti-Human-IG G(Globulin)Serum aus dem Kaninchen der Firma Hyland, seine Verdünnung von 1:2 und ein Anti-Human-Serum aus der Ziege derselben Firma sowie eine NaCL-Lösung als Kontrolle waren Partner eines Diffusionstestes.

Im Gegensatz zu den Vorversuchen mit der Kuhmilch wurde die Agarlösung modifiziert: 1 g Agar und 50 ml Aqua dest. wurden in einem zu verschließenden Erlenmeyerkolben im Wasserbad erhitzt. Nach etwa 5 Minuten wurde ein heißes Gemisch von 22,3 ml einer Stammlösung und 16,8 ml Aqua dest. dazugegeben. Das Gemisch wurde nun so lange erhitzt, bis sich alle Agarteilchen gelöst hatten. Die Stammlösung wurde als Puffer mit einem pH von 8,6 aus Veronal, Na-Veronal, Calciumlaktat und Aqua dest. hergestellt. 2 ml dieser heißen Lösung wurden wiederum auf 5 x 5 cm große Diaplättchen mit einer Pipette aufgebracht. Nach dem Erstarren des Agargels wurden in der beschriebenen Weise die Löcher ausgestanzt. Die Inkubation der Gelplatten in feuchten Kammern und die Färbung erfolgte nach der mitgeteilten Technik der ersten Versuchsreihe. Die Versuchsanordnung ist aus folgender Skizze ersichtlich:



1 Thymusgewebsbrei
2 unverd. Anti-Human-IG G
3 1:2 verd. Anti-Human-IG G
4 NaCl-Lösung
5 Anti-Human-Serum

V.4.1.1. Ergebnisse

In der gewählten, für alle Versuche einheitlichen Anordnung sah man zwischen dem mit Thymusbrei gefüllten, zentralen Loch und dem mit Anti-Human-Serum drei bis fünf Präzipitationslinien. In der Regel war eine der mit Anti-Human-Serum beschickten Höhlung am nächsten benachbarte Bande etwa 2 mm breit und scharflinig in Diffusionsrichtung des Thymusgewebsbreies begrenzt. Ort, Breite, Dichte, Ausdehnung und Stabilität der Präzipitationsbanden entsprachen sich weitgehend bei den untersuchten Thymusdrüsen. Die Auftragsstellen des Anti-Human-Serums zeigten unterschiedlich breit gefärbte Höfe.

Die Kontrollen mit NaCl-Lösung wiesen keine Präzipitationen auf.

Die Auftragsstellen des Thymusgewebsbreies zeigten mit Ausnahme der Thymusdrüsen 156, 174, 176, 181 diffus getrübte Höfe unterschiedlicher Ausdehnung.

Zwischen den Höhlungen, die einerseits mit unverdünntem Anti-Human-IG G(-Globulin)Serum und andererseits mit Thymusbrei beschickt waren, sah man mit Ausnahme der Platte 18/67 jeweils eine Präzipitationslinie. Sie lag in der Regel in der Mitte zwischen den Auftragsstellen; die Dichte schwankte von einer linienförmig gezogenen Präzipitation bis zu einer diffus getrübten 2 mm breiten Zone, die selten in Diffusionsrichtung des Thymusgewebsbreies, häufiger in Diffusionsrichtung des Anti-Human-IG G scharf begrenzt war; meistens konnte eine scharfe Begrenzung nicht ausgemacht werden. Dichte, Ausdehnung, Stabilität der Linien unterschieden sich in den Versuchen nur geringfügig von einander.

Schwache Präzipitationen waren bei den Thymusdrüsen 60, 174, 52, 29, 120 und 163 mit dem 1:2 verdünntem Anti-Human IG G(-Globulin)Serum zu erkennen.

Die Milzen der Fälle 174 und 60 wurden in gleicher Weise wie die Thymusdrüsen behandelt und als Diffusionspartner mit den angegebenen Reaktanten untersucht. Dabei fanden sich keine prinzipiellen Unterschiede zu den Thymusdrüsen.

V.4.2. Präzipitationsversuche mit Immunfluoreszenz

Fluoreszenzmikroskopisch wurden die Thymi 171, 174 und 156, 177 untersucht.

Es wurden kleine Würfel aus den tiefgefrorenen Thymusdrüsen herausgeschnitten und mit Kohlensäureschnee auf Objekthalter des Gefriermikrotoms (Kryostat) nach Dr. Pearse aufgefroren. Gleichmäßige, bis 4 µ dicke Gefrierschnitte konnten vom Thymusgewebe nur schlecht angefertigt und vor allem kaum auf Objektträger aufgezogen werden, weil der Schnitt zäh und grießelig war. Darum fertigten wir Schmierpräparate an, die für die cytologischen Untersuchungen von vornherein günstiger erschienen.

Die Fixierung der Schmierpräparate erfolgte in reinem Methanol und zum Vergleich auch in 70 %igem Äthanol bei Zimmertemperatur. Um die günstige Fixierungszeit festzustellen, fixierten wir mindestens je 4 Präparate 2 bis höchstens 20 Minuten, einige blieben unfixiert.

Anschließend wurden die fixierten Präparate in gewechselt physiologischer Kochsalzlösung geschwenkt oder 1/2 Minute in frischer Lösung belassen. Durch leichtes Kanten der Objektträger lief die überstehende Spülflüssigkeit besser ab.

Auf die Präparate wurde dann das Anti-Human IG G - Serum getropft und die Schnitte in einer feuchten Kammer bei 37°C etwa 30 Minuten inkubiert.

Danach wurden die Präparate entweder mehrmals in häufig erneuerter physiologischer Kochsalzlösung geschwenkt und 1 bis 2 Minuten in der Lösung gewässert oder 5 Minuten in

der Lösung belassen; das letzte Verfahren erwies sich für die Präparate schonender, da nicht zu viel Substanz dabei verloren ging.

Nach Kanten der Objektträger und Abfließen der Waschflüssigkeit wurde auf die Präparate ein fluoreszeinmarkiertes Anti-Kaninchen-IG G - Serum von der Ziege (Behring) aufgetragen, anschließend in einer feuchten Kammer bei 37°C 30 Minuten inkubiert.

Das Waschen der Präparate in physiologischer Kochsalzlösung erfolgte jetzt ausgiebiger: je nach Ausfall der vorhergehenden Präparate 10 bis 15 Minuten, damit die nichtgebundene markierte Lösung restlos ausgespült werden konnte.

Die Präparate wurden luftgetrocknet und sofort untersucht.

Zur Kontrolle der spezifischen Fluoreszenz wurden jeweils mindestens 2 Präparate bei vorgegebener Fixationszeit und gewähltem Fixationsmittel ohne Anti-Human IG G und nur mit dem fluoreszeinmarkierten Anti-Kaninchen-IG G - Serum in derselben Weise wie die Testpräparate behandelt.

Zur Prüfung einer Autofluoreszenz der Thymusstrukturen diente je 1 unbehandeltes, unfixiertes und fixiertes, nicht gefärbtes Schmierpräparat.

Die Schmierpräparate des Thymus 156/67 wurden außerdem mit fallenden Verdünnungen des Anti-Human IG G - Serums 1:2 bis 1:16 und mit 1:2 und 1:4 verdünntem fluoreszeinmarkiertem Anti-Kaninchen IG G-Serum kombiniert und in beschriebener Weise behandelt.

Die Präparate wurden im großen Zeiss-Photomikroskop mit Fluoreszenzeinrichtung und Quarzoptik im Phasenkontrast mit Ölimmersion untersucht.

Das UV- und Blaulicht stammte von einer HBO-Osram 200 W Hg-Lampe mit einem diskontinuierlichen Spektrum: 313, 334, 366, 405, 436 nm (und 546, 578 nm).

Von den zur Auswahl vorhandenen Erregerfiltern

Nr.	I	BG	12/4	Durchlaßbereich	33o-55o nm,	Maximum 4oonm
	II	BG	3/4	"	27o-48o "	" 32o-4oo "
	III	UG	5/3	"	22o-42o "	" 3oo-37o "
	IV	UG	1/3	"	3oo-4oo "	" 35o "

und den hauptsächlich benutzten Sperrfiltern 41, 44, 47, 50, 53 wählten wir verschiedene Kombinationen: I 53/44, II 50/44, III 47/65 und IV/41. Nahezu alle Untersuchungen erfolgten jedoch mit der Filterkombination I + II 50/44.

V.4.2.1. Immunfluoreszenztechnik

1942 veröffentlichte COONS eine Methode, die unmittelbar ortsständige kleinste Antigenmengen mit fluoreszeinmarkierten Antikörpern mikroskopisch darzustellen erlaubte. Inzwischen wurde sie erweitert, vielfach modifiziert.

Unserer Darstellung dieser Technik liegen zusammenfassende Arbeiten v.MAYERSBACH (1958/66), NAIRN und FOTHERGILL (1962) zugrunde.

Das Prinzip der neuen Technik liegt in der serologischen Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper zur Identifizierung und in der Fluoreszenz zur Lokalisation eines Antigens oder eines Antikörpers. Die Eigenschaften eines Antikörpers werden durch die Bindung an den Fluoreszenzfarbstoff nur geringfügig verändert.

Die Anregung zur Lichtemission durch Absorption von Energie wird als Fluoreszenz bezeichnet. Wird ein Fluorochrommolekül von einer energiereichen Strahlung, z. B. UV-Licht getroffen, so ändert sich sein Schwingungszustand: Die Atomkerne und Elektronen schwingen stärker, sie besitzen mehr Energie. Kehren sie nun aus ihrem energiereicheren, "angeregten" Zustand auf ihren "Grundzustand" zurück, so emittieren sie in der Regel Licht einer längeren Wellenlänge (WALTER 1964).

Die Herstellung eines geeigneten fluoreszeinmarkierten Immunserums geschieht praktisch so, daß Tiere mit anti-

genen Substanzen immunisiert werden. Aus dem gewonnenen Serum werden die Globuline durch Salzlösungen ausgefällt und nachher mit einem Fluorochrom gekoppelt. Die Immunglobuline sind als Proteine gegen physiko-chemische Einwirkungen nicht unempfindlich: grobe pH-Verschiebungen, Wärme, bestimmte Lösungsmittel, ungeeignete Konzentrationen von Farbstoffen, bestimmte chemische Gruppen einer Substanz.

Dem stabilen Farbstoff Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) wird heute der Vorzug gegeben. Die Absorptionsmaxima seiner Proteinkonjugate liegen bei 278 und 494 nm, das Emissionsmaximum bei 517 nm; die Anregung erfolgt mit Licht von 280, 320 oder 490 nm (HANSEN).

Das FITC, das in zwei Isomeren vorliegt, verbindet sich mit seiner reaktiven Gruppe kovalent mit der terminalen Aminogruppe des Proteins oder mit der ε-Aminogruppe des Lysins.

Die Reinigung der Proteinkonjugate von freiem, nichtgebundenem FITC geschieht schonend am besten durch Gelfiltration, die Auftrennung der Proteinkonjugate mit unterschiedlichen Farbstoff-Protein-Bindungsraten erfolgt über DEAE-Cellulose-Sephadex-Säulen.

Die unspezifischen Färbungen von Zellen und Geweben sind teils durch den nicht restlos entfernten ungebundenen Farbstoff, teils durch die mit FITC überladenen Gammaglobuline bedingt. Eine weitere Ursache sieht MAYERSBACH (1966) in folgender Tatsache: Die elektrostatische Ladung des konjugierten Proteins differiert bei demselben pH-Wert vom nativen, weil durch die Einführung der negativen Gruppen des FITC der isoelektrische Punkt des Globulins zur sauren Seite verschoben wird. Dadurch erhält das konjugierte Protein eine höhere anionische Beweglichkeit und verbindet sich leichter mit den basisch reagierenden Gewebsproteinen.

Die immunologische Aktivität der konjugierten Globuline ist vermindert, weil meist zu viele Farbstoffmoleküle an einen Antikörper gebunden werden und dabei in der Regel auch die Aminogruppen des immunologisch aktiven und spezifischen Bezirks besetzt werden.

Die Empfindlichkeit der Immunfluoreszenztechnik ist hoch; COONS schätzt die nachweisbare Grenzkonzentration beim Pneumokokken-Kapsel-Polysaccharid auf $o,8 \times 1o^{-4} ug/nm^2$ (POETSCHKE 1967).

Bei der Herstellung histologischer Präparate ist zu berücksichtigen, daß schon geringfügige Eingriffe im Antigen-Antikörper-System zur Denaturierung der Immunproteine führen können. Aus diesem Grunde eignet sich für die Gewebspräparation am besten die Kryostat-Technik.

Außerdem können Antikörpersubstanzen aus den bereits fixierten Präparaten während der Inkubation mit Immunseren und durch das Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung herausgelöst werden.

Für die Beurteilung der Testpräparate sind unbedingt Spezifitätsproben heranzuziehen: Beim indirekten Antikörpernachweis ist die Zwischenschicht vor der Inkubation mit dem markierten Immunserum fortzulassen, und nach Möglichkeit sollten die Schnitte noch mit einem heterologen Serum vor der Inkubation mit markierten Antikörpern abgesättigt werden.

V.4.2.2. Ergebnisse

Im Phasenkontrast sieht man hauptsächlich runde Zellen in Größe der Lymphozyten. Ein Cytoplasma kann man nicht erkennen; die Kernsubstanz ist nahezu ausnahmslos körnig oder schollig fragmentiert und bei kleiner Vergrößerung als runder bis ovaler Kern angeordnet. Erst bei stärkerer Vergrößerung zeigt sich in der Begrenzung der Kernsubstan-

zen die Vielgestaltigkeit: Einbuchtungen unterschiedlichen Grades, Ausziehungen und kleine Fortsätze, polartige Anlagerungen von fragmentierter Kernsubstanz, bizarre Begrenzungen. Zwischen den runden Zellen liegen ausgeflossene Kerne, die in kleinste strichförmige Partikel fragmentiert sind. In manchen Gesichtsfeldern sind nahezu nur Massen unregelmäßig geformter, kleinster Partikel fragmentierter Kernsubstanzen zu sehen.

Morphologisch lassen sich die runden Zellen am ehesten als lymphoide bzw. als Lymphozyten klassifizieren. Segmentierte Kerne einiger Zellen kommen gestaltlich dem Kern eines Leukozyten am nächsten.

Im Fluoreszenz-Phasenkontrast wurden Zellmorphe und Intensität der fluoreszierenden Zellen beurteilt:

In unbehandelten Präparaten sah man selten hellfluoreszierende Zellen; ihr Cytoplasma war auch im bloßen Phasenkontrast nicht auszumachen. Eine Zuordnung zu den Leukozyten konnte morphologisch nicht eindeutig erfolgen.

In Kontrollpräparaten, die nur mit fluoreszeinmarkierten Antikörpern inkubiert und anschließend gewaschen worden waren, konnte man eine Fluoreszenz feststellen, die in ihrer Intensität bei den unterschiedlich lang und mit chemisch verschiedenen Fixationsmitteln behandelten Präparaten nicht eindeutig voneinander differierte. Das längere und gründlichere Spülen nach Inkubation mit dem markierten Immunserum verminderte jedoch die Fluoreszenzintensität, wobei allerdings mehr Material vom Präparat weggespült wurde. Die relativ schwache Fluoreszenz war hauptsächlich an den Partikeln der fragmentierten Kernsubstanzen festzustellen. Der Kern der von uns als Lymphozyten gedeuteten runden Zellen fluoreszierte in der Regel nicht, nur vereinzelt sah man an seiner Peripherie fluoreszierende Bezirke, die Anlagerungen kleiner

Partikel zu sein schienen.

Bei den mit zwei Schichten inkubierten Präparaten konnte eine stärkere Fluoreszenz festgestellt werden. Besonders einige Lymphozyten wiesen um ihren Kern hellfluoreszierende, homogene Höfe, bandförmige fluoreszierende Zonen oder polartige fluoreszierende Kappen auf. Selten sahen wir ein hellfluoreszierendes Kernzentrum. Mitunter fanden wir Zellen mit dunklem Kern, dem eine hellfluoreszierende partikelartige Substanz auf- und angelagert zu sein schien. Ob ein gradueller Unterschied in der Fluoreszenzintensität der beschriebenen Kerntrümmer in Test- und Kontrollpräparaten bestand, konnte nicht genügend festgestellt werden.

Die unterschiedlich behandelten Testpräparate bestätigten im Prinzip das Ergebnis der Kontrollen: Länger und gründlich gespülte Präparate zeigten an weniger Stellen eine Fluoreszenz, jedoch war keine Intensitätsabnahme zu erkennen.

Die Schmierpräparate mit fallenden Serumverdünnungen zeigten lediglich geringfügige Fluoreszenzeinbußen.

VI. Diskussion

Bei unseren fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnten wir Thymuslymphozyten nicht von peripheren Lymphozyten der übrigen lymphatischen Organe differenzieren, weil sie sich nicht morphologisch (KINDRED 1940), sondern funktionell durch ihre Aktivität und Reaktivität unterscheiden. (KINDRED 1940, METCALF 1962, ANDREASEN und OTTESEN 1944, BILLINGHAM und SILVERS 1964). Aus diesem Grund ist der Gehalt der Blutlymphozyten in den Präparaten unbekannt.

Der Thymusgewebsbrei für unsere Diffusionsversuche wurde von hart gefrorenen und Schmierpräparate von weitgehend aufgetauten Thymusdrüsen angefertigt. Ob nun das Material aus vorwiegend erweichten Bezirken der Thymi stammt, kann am ehesten andem relativen Zellenmangel und den Kerntrümmern in den Schmierpräparaten vermutet werden.

Wenn auch die Lymphozytenkerne körnig, schollig, fädig fragmentiert im Phasenkontrast erschienen, kann man nicht feststellen, ob sie durch zytolytische oder autolytische Reaktionen verändert wurden. Denn die höhere funktionelle Reaktivität der Thymuslymphozyten führt unter verschiedenartigen Einwirkungen auf den Organismus zur Lymphokaryoklasie: Hunger, Ernährungsstörungen, Erschöpfungszustände, Vaccinationen, Intoxikationen, Röntgenbestrahlungen, Kälteeinwirkungen und vor allem Infektionen führen zu graduellen Einschmelzungen der Thymusdrüsen (TESSERAUX 1959).

Die postmortale Autolyse der Thymuslymphozyten muß beachtet werden, weil sie durch ihren katabiotischen Stoffwechsel nicht nur die Zellstruktur, sondern auch die Immunfluoreszenz verändert.

Das Wesen der Autolyse entwickelt LETTERER (1959) in seinem Lehrbuch der "Allgemeinen Pathologie" vom Stoffwechselgeschehen: Dissimilation, Leistungsverminderung und Stoff-

verbrauch fallen unter Katabiose. Sie kann bei völlig sistierter Assimilation weiterlaufen, weil Zellfermente wirksam werden, wenn die autonome Selbststeuerung der Zelle aufhört. Die Aktivität dieser Enzyme ist von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig. Wegfall der Pufferkapazität des Blutes und mangelnder Abtransport von Stoffwechselprodukten führen zur pH-Erniedrigung.

"Wenn die Katabiose zunimmt, so bedeutet dies zunehmenden Abbau, Desorganisation der organischen Strukturen. Somit gelangen diese Vorgänge in den Bereich der formalen Nachweisbarkeit, seien sie im Makroskopischen, Mikroskopischen oder Submikroskopischen gelegen. Dann sprechen wir von Autolyse, worunter die Tätigkeit der in der Zelle vorhandenen Fermente verstanden wird, welche die zelleigenen Bestandteile einer Lysis zuführen, im Gegensatz zur Heterolyse, der Wirkung der von außen in die Zelle eindringenden Fermente."

Da die Autolyse mit einer pH-Erniedrigung einhergeht, kommt es in der Regel zu keiner Anfärbung der Zelle mit einem Fluorochrom-Proteinkonjugat, es sei denn, daß das Zytoplasma basisch reagiert oder daß die Nucleinsäuren des Kernes depolymerisiert sind und die Bruchstücke während der Färbung extrahiert werden und das zurückgebliebene, basisch reagierende Histongerüst das Proteinkonjugat unspezifisch bindet.

Ungeklärt blieb in unseren Versuchen der zytolytische und autolytische Effekt auf zellständige Immunglobuline; ob sie dabei herausgelöst werden und trotzdem ihre volle immunologische Aktivität behalten, wurde nicht geprüft.

Die langsame Einfrierung der Thymusdrüsen könnte die humoralen und sessilen Immunglobuline in ihrer Aktivität durch Aggregations- und Desaggregationseffekte beeinflussen, die als Folge der Eisbildung und der Erhöhung der Ionenkonzentration in der flüssig gebliebenen Restlösung

aufzufassen wären (NORD und BIER 1952). SCHEIFFARTH, GÖTZ und CERNY (1965) haben immunelektrophoretisch nachgewiesen, daß bei Einfrierung und sogar wiederholtem Auftauen von Serumproteinen "keine nennenswerten quantitativen oder gar qualitativen Veränderungen an den Seren auftraten."

In unseren Agargeldiffusionsversuchen haben wir lediglich die Präzipitation eines Antigen-Antikörper-Komplexes nachweisen können. Dabei bleibt unentschieden, ob tatsächlich ursprünglich zellständige Antikörper neben humoralen an der Präzipitation teilgenommen haben.

Das negative Ergebnis des Diffusionstestes auf spezifische Immunglobuline gegen Kuhmilchproteine ist schwer begründet zu deuten: Entweder enthielt der Thymusgewebsbrei keine oder zu wenige spezifische Antikörper oder es erfolgte eine Auflösung des Präzipitates im Antigenüberschuß trotz der hohen Verdünnung der Kuhmilch. Daß die Immunglobuline während der Diffusion hätten verändert werden können, ist unwahrscheinlich nach dem positiven Nachweis allgemeiner Immunglobuline mit dem Anti-Human IG G - Serum. Die Diffusionsfähigkeit der Zellpartikel scheint vorhanden zu sein, für Serumbestandteile ist sie jedenfalls im positiven Präzipitationsmuster demonstriert.

Empirisch weiß man, daß Kaninchen auf Kuhmilch- und Kuhseruminjektionen mitunter weniger gut Antikörper bilden. Art, Rasse, Nahrung, Alter, Geschlecht bestimmen die Antikörperproduktion; selbst bei untereinander gleichen Voraussetzungen variiert die Immunglobulinbildung von Individuum zu Individuum, außerdem wird sie von der Injektionsmenge, der Injektionsart und den Injektionsabständen beeinflußt (UHLENHUTH, SEIFFERT 1930).

Da wir keine keimfreie Kuhmilch zur Injektion gewinnen konnten, muß man mit spezifischen Antikörpern auf die be-

gleitenden Bakterienantigene rechnen.

Das Anti-Human-IG G Serum aus dem Kaninchen der Firma Hyland erwies sich in unserer immunelektrophoretischen Analyse durch eine charakteristische Präzipitationslinie rein und einheitlich.

Eine genaue papierelektrophoretische Trennung und Auswertung des fluoreszeinmarkierten Anti-Kaninchen IG G Serums der Firma Behring konnte nicht durchgeführt werden.

Die Beurteilung der immunfluoreszenzmikroskopischen Befunde kann nur mit größten Vorbehalten erfolgen, weil Möglichkeiten einer Störung des Antigen-Antikörper-Systems nicht nur durch die experimentellen Eingriffe selbst, sondern vor allem durch die zytolytischen oder autolytischen Reaktionen gegeben sind.

Eine potentielle Denaturierung oder partielle Verminderung der immunologischen Aktivität der Antikörper des Thymus durch die Fixierung wurde ohne Nachweis in Kauf genommen. Die Wässerung der Präparate erfolgte in einer ungepufferten physiologischen Kochsalzlösung, die gewiß nur geringe pH-Verschiebungen des zytologischen Untersuchungsmaterials zur Folge hatte.

Die Morphe der fluoreszierenden Bezirke: homogener Hof, perinucleäre bandförmige Zone ist wenig charakteristisch für eine spezifische Immunfluoreszenz. Die mäßige Fluoreszenz der Kerntrümmer und mancher Lymphozytenkerne kann nach v.MAYERSBACH am einsichtigsten als unspezifische Anfärbung des basisch reagierenden Histongerüstes der Kernsubstanzen mit dem Proteinkonjugat oder gar mit dem nicht restlos entfernten Fluorochrom erklärt werden.

VII. Zusammenfassung

Der plötzliche und unerwartete Tod im Säuglings- und Kindesalter, dessen Eintritt aus dem vorangegangenen Geschehen nicht befriedigend erklärbar erscheint, ist in seiner Ätiologie und Pathogenese weitgehend ungeklärt.

Die Infektionen hauptsächlich am kindlichen Respirationstrakt, weniger am Verdauungsapparat werden von den meisten Autoren als ätiologisches Moment für den Eintritt des plötzlichen Todes gedeutet. Ihn charakterisieren oft das geringfügige morphische pathologische Substrat, der vieldeutige bakteriologische Befund und die meist nicht gelungene Isolierung eines Virus.

Auch Hypogammaglobulinämien, Elektrolytverschiebungen mit Kalziumverminderung und relativer Kaliumzunahme, seltene Synkopen und Reflexmechanismen werden zur Erklärung des plötzlichen Todes im Säuglingsalter herangezogen.

Der Status thymico-lymphaticus als prädisponierendes Moment des plötzlichen letalen Geschehens wird generell abgelehnt.

Englische Autoren postulieren letale anaphylaktische Reaktionen als potentielle Ursache des plötzlichen Todes bei Kindern, die bei einer erworbenen Hypersensibilität gegen Kuhmilchproteine regurgitierten Mageninhalt aspirieren.

Zum Verständnis der immunologischen Verhältnisse im Säuglingsalter und zur kritischen Beurteilung eigener immunfluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen wurden in dieser Arbeit die humorale und zelluläre Abwehr skizziert und die immunologischen Grundbegriffe erwähnt.

Ein kurzer Überblick der bisherigen Beobachtungen immunologischer Funktionen des Thymus schließt den theoretischen Teil dieser Arbeit ab.

20 Thymusdrüsen plötzlich und unerwartet verstorbener Säuglinge, verunglückter Kleinkinder und junger Erwachsener wurden mit der Agargeldiffusionsmethode nach OUCHTERLONY auf ihren Gehalt an Immunglobulin Ig G geprüft. Bis auf eine Ausnahme konnten spezifische Präzipitationen nachgewiesen werden.

Der Gewebsbrei zweier Thymusdrüsen wurde in einem modifizierten Agargel auf spezifische Antikörper gegen Kuhmilchproteine getestet. Immunpräzipitate konnten nicht demonstriert werden.

Für die Gewinnung spezifischer Immunglobuline wurden zwei Kaninchen mit keimarmer Kuhmilch immunisiert. Wegen des geringen Titers verzichteten wir darauf, das Immunserum mit Fluoreszeinisothiocyanat zu koppeln, weil die schon geringe immunologische Aktivität durch den Markierungsvorgang zusätzlich vermindert worden wäre. Der Nachweis zellständiger Antikörper gegen Kuhmilchproteine im Thymusgewebe unterblieb daher.

Im Fluoreszenz-Phasenkontrast wurden vier Thymusdrüsen auf sessile Immunglobuline nach der Methode von COONS untersucht. Zytolytische und autolytische Veränderungen der untersuchten Zellen und die experimentellen Eingriffe beeinträchtigten einen einwandfreien Nachweis zellständiger Antikörper.

Mit unseren Untersuchungen können wir keinen Beitrag zu einer immunpathologischen These des plötzlichen Säuglingstodes leisten. Wir meinen aber, daß eine gerichtsmedizinische Begutachtung plötzlich verstorbener Säuglinge sich nicht nur auf eine sorgfältige Sektion und exakte histologische Untersuchung beschränken, sondern Vergiftungen ausschließen und sich um Nachweis von Virusarten und pathogenen Keimen bemühen sollte.

ADELSON, L. and E. R. KINNEY: Sudden and unexpected death in infancy and childhood. Pediatr. 17, 633 - 697 (1956).

ANDREASEN, E. and J. OTTESEN: Studies on the lymphocyte production. Investigations on the nucleic acid turnover in the lymphoid organs. Acta physiol. scand. 10, 258-270 (1945).

AUERBACH, R.: Experimental analysis of the origin of cells in the development of the mouse thymus. Developmental Bio. 3, 336 - 354 (1961).

AUERBACH, R.: Function of embryonic thymus. Wistar Insitute Symp. Monogr. No. 2 "The Thymus" edited by Defendi, V. and D. Metcalf, S. 1 - 8, Philadelphia 1964.

AXELRAD, A. A. and H. C. VAN DER GAAG: Susceptibility to lymphoma induction by Gross'passage A virus in C 3 Hf/Bi mice of different ages: Relation to thymic cell multiplication and differentiation. J.Nat. Cancer Inst. 28, 1065 - 1093 (1962).

BANGHAM, D. R.: The transmission of homologous serum proteins to the foetus and to the amniotic fluid in the Rhesus monkey. J.Physiol.Lond. 153, 265 - 289 (1960).

BARRETT, A. M.: "Sudden death in infancy" in Recent Advances in Pedriatrics edited by D. Gairdner London: J. and A. Churchill 1954, p. 301.

BEARD, J.: The source of leukocytes and the true function of the thymus. Anat. Anz. 18, 550 - 560 and 561 - 573 (1900).

BILLINGHAM, R. E. and W. K. SILVERS: Some biological differences between thymocytes and lymphoid cells. The Wistar Inst. Monogr. 2, p. 41-48, Philadelphia 1964.

BLOCK zit. nach MILLER, J.F.A.P. und P. DUKOR: Die Biologie des Thymus. Frankfurt: Akad.Verlagsges.1964.

BREEN, G. E.: Allergy, immunity and tolerance. Lancet 1962/I, 1363 - 1369.

BRAUNSTEINER, H., R. HÖFER und S. SAILER: Der Lymphozyt. Dtsch. med. Wschr. 86, 721 - 727 (1961).

BRAUNSTEINER, H., F. DIENSTL und S. SAILER: Das Lymphozytenproblem. Med. Klinik 58, 652 - 655 (1963)

BRAUNSTEINER, H.: Entstehen die Plasmazellen aus Lymphozyten? Dtsch. med. Wschr. 89, 45 - 46 (1964).

BURNET, F. M.: The immunological significance of the thymus: An extension of the clonal selection theory of immunity. Austral. ann. med. 11, 79 - 91 (1962).

BURNET, F. M.: Antikörper und Immunität. Med. Prisma 1, Ingelheim: Boehringer & Sohn 1965.

CAMERON, A. H. and P. ASHER: Cot deaths in Birmingham 1958 - 61. Med., Science and the Law 1965, 187 - 199.

CLARK jr., S. L.: The penetration of proteins and colloidal materials into the thymus from the blood stream. The Wistar Inst. Monogr. No 2, pp. 9-31, Philadelphia 1964.

CLARK jr., S. L. : Cytological evidences of secretion in the thymus. In "Thymus Experimental and clinical studies" Edited by Wolstenholme, G.E.W. and R. Porter, London: J. & A. Churchill 1966, pp. 3 - 38.

COONS, A.H. and M. H. KAPLAN: Localization on antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. Exp. Med. 91, 1 - 13 (1950).

DANCIS, J., N. BRAVERMAN and J. LIND: Plasma protein synthesis in the human fetus and in placenta. J. clin. Invest. 36, 398 (1957).

DAVISON, W. H.: Accidental infant suffocation.Brit.med. J. 1945/II, 251 - 252.

DOUGHERTY, T. F., M. L. BERLINER and D. L. BERLINER: Hormonal control of lymphocyte production and destruction. Progr. Hemat. III, 155 - 169 (1962).

EDELMAN, G. M. and J. A. GALLY: A model for the 7 S antibody molecule. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash) 51, 846-853 (1964).

EHRLICH, P. zit. n. P. Grabar: Grundbegriffe der Immunologie in P. Miescher und K.O. Verländer: Immunopathologie in Klinik und Forschung. Stuttgart: G. Thieme 1961.

FLEISCHMANN, J. B., R. R. PORTER and E. M. PRESS: Arrangement of peptide chains in gamma globulin. Biochem. J. 88, 220 - 228 (1963).

FORD, C. E.: Traffic of lymphoid cells in the body. In "Thymus Experimental and clinical studies" ed. by E.W. Wolstenholme and R. Porter London: J. & A. Churchill 1966, pp. 131-152

GANGHOFNER, F.: Plötzliche Todesfälle im Kindesalter. Verh. der 19.Vers.f.Ges.für Kinderhlk, in Karlsbad 1902, Wiesbaden: J.F. Bergmann 1903 S. 44 - 62.

GARROW, J. and J. WERNE: III. Pathologic findings in infants dying immediately after violence, contrasted with those after sudden apparently unexplained death. Amer. J. Path. 29, 833 - 851 (1953).

GARSCHE, R.: Der plötzliche Tod im Kindesalter. Ergn. inn. Med. Kinderhk. 1, 139 - 175 (1949).

GARVEY and CAMPBELL zit. n. Grabar, P.

GLOOR, B., P. NEF und H. U. ZOLLINGER: Otitis media (occulta) und bakterielle Intoxikationen im Säuglingsalter. Schweiz. Med. Wschr. 91, 996 - 1000 (1961).

GOLD, E., D. H. CARVER, H. EISENBERG, L. APPELSON and F. C. ROBBINS: Viral infection. A possible cause of sudden, unexpected death in infants. New Eng.J.Med. 264, 53-60 (1961).

GOOD, R. A. and S. J. ZAK: Disturbances in gamma globulin synthesis as "Experiment of Nature". Pediatr. 18, 109 - 149 (1956)

GOOD, R. A., A. GABRIELSEN, R. D. A. PETERSON, J. FINSTAD and M. D. COOPER: The development ofthe central and peripheral lymphoid tissue: ontogenetic and phylogenetic considerations. In "Thymus Experimental and clinical studies" ed. by G.E.W. Wolstenholme and R. Porter, London: J. & A. Churchill 1966, pp. 181 - 206.

GORDON, H. A.: Morphological and physiological characterization of germfree life. Ann. N. Y. Acad. Sci. 78, 208-220 (1959).

GOWANS, J.L., B.M. GESNER and D.D. Mc GREGOR: The immunological activity of lymphocytes. In Biological activity of leucocyte. Ciba Found. Study Group No. 10 G.E.W. Wolstenholme and M.O.'connor, eds. p. 32-44, London:Churchill 1961.

GOWANS, J.L.: The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. J. Physiol. Lond. 143, 84 P (1958).

GRABAR, P.: Grundbegriffe der Immunologie. In P.Miescher und K.O.Vorländer: Immunopathologie in Klinik und Forschung 2. Aufl., Stuttgart: G. Thieme 1961, S. 1 - 61.

GRUENWALD, P. and M. JAKOBI: Mononuclear pneumonia in sudden death or rapidly fatal illness in infants. J.Pediatr. 39, 650-662 (1951).

GÜNTHER, O.: Die Entstehung der Antikörper.Umschau 66, 89 - 94 (1966)

GÜNTHER, O.: Nichtentstehung der Antikörper und biologische Individualität. Umschau 66, 105 - 108 (1966).

GÜNTHER, O.: Immunität, Allergie und Immunbiologie.Dtsch. Arztebl.-Arztl.Mitt. 63, 1902 - 1903 (1966).

GÜNTHER, O.: Immuntoleranz und Immuninsuffizienz.Dtsch.med. Wschr. 92, 1118 - 1119 (1967).

GUNDOBIN zit. n. Tesseraux, H. Physiologie und Pathologie des Thymus. Leipzig: Barth 1959

GUNTHER, M., R. ASCHAFFENBURG, R.H. MATTHEWS, W.E. PARISH and R.R.A. COOMBS: The level of antibodies to the proteins of cow's milk in the serum of normal human infants. Immunology 3, 296 - 306 (1960).

GUNTHER, M., E. CHEEK, R.H. MATTHEWS and R.R.A. COOMBS: Immune responses in infants to cow's milk proteins taken by mouth. Int. Arch. Allergy 21, 257 - 278 (1962).

HAMMAR, J.A. Über die normalen Durchschnittsgewichte der menschlichen Thymusdrüsen. Vjschr.f.ger.Med. 37, 23-27 (1909).

HAMMAR, J.A.: The new views as to the morphology of the thymus gland and their bearing on the problem of the function of the thymus. Endocrinology 5, 543-573 (1921).

HANSEN zit. n. v. Mayersbach

HARRIS, S. and T.N. HARRIS: Studies on transer of lymph node cells; effects of variation in interval between injection of antigen into donor and collection of lymph node cells. J. exp. Med. 100, 269 - 287 (1954).

HARRIS, T. N.: Cellular Sources of Antibody. A review of recent development. Med. clin. N. A, 49, 1517 - 1531 (1965).

HARRIS, S. and T.N. HARRIS: The genesis of antibodies. Amer. J. Med. 20, 114 (1956).

HAUROWITZ, F.: Role of the antigen in antibody formation. 15.Coll.Ges.physiol.Chem. Mosbach. In Immunchemie, Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1965, S. 240 - 249.

HEIDELBERGER, M. and F.E. KENDALL: A quantitative study of the precipitin reaction between Type III Pneumococcus polysaccharide and purified homologous antibody. J.exp.Med. 50, 809 - 823 (1929).

HEIDELBERGER, M.: Quantitative absolute methods in the study of antigen-antibody reaction. Bacter. Rev. 3, 5o-95 (1939) zit. n. Grabar

HITZIG, W. H. und H. WILLI: Hereditäre lymphoplasmacytäre Dysgenesie ("Alymphocytose mit Agammaglobulinaemie").Schweiz. med. Wschr. 52, 1625 - 1633 (1961).

HITZIG, W. H.: Das Bluteiweißbild im Säuglingsalter. Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. 17, 228 (1961) zit. n. v. Muralt.

HITZIG, W. H.: Immunbiologische Reaktionen des cellulären und des humoralen Systems. Schweiz. med. Wschr. 93, 1433-1444 (1963).

HOEDT, W. und K. PFEIFER: Todesursachen plötzlich und unerwartet verstorbener Kinder (1950-1965).Dtsch.Gesd.wes.21, 1441 - 1448 (1966).

ISAACS, A. and J. LINDEMANN zit. n. Sigel

JACOBSEN, T. and J. VOIGT: Sudden and unexpected infant death. Acta Med. Leg. Soc. Liege 9, 117 - 131 (1956).

JANEWAY, C. A., L. APT and D. GITLIN: Agammaglobulinemia. Trans. Ass. Amer. Phyc. 66, 200 - 202 (1953).

KALLMAN, R. F. and H. I. KOHN: The reaction of the mouse thymus to x-rays measured by changes in organ weight. Radiat. Res. 2, 280-293 (1955) zit. n. Miller, J.F.A.P.

KELLER, W.: Allergie, Immunität und Entzündung. Dtsch. med. Wschr. 91, 2321 - 2328 (1966).

KINDRED zit. n. J.F.A.P. Miller

KLEMM, D.: Die Immunglobuline des menschlichen Serums. Med. Klinik 61, 1853 - 1856 (1966)

LANDSTEINER zit. n. P. Grabar

LEBLOND, C. P. and G. SAINTE-MARIE:Models for lymphocyte and plasmacyte formation in "Haemopoiesis: Cell production and its regulation. Ciba Found.Symp. G.E.W.Wolstenholme and M.O'Connor, Lond.: Churchill 1960 p.152-184.

LETTERER, E.: Allgemeine Pathologie. Stuttgart: G.Thieme 1959 S. 147 - 156 und S. 149

MAHNKE, P. F.: Epidemiologie und spezielle Pathologie des plötzlichen Todes im Kindesalter. Dtsch.Gesd.wes. 21, 1966 (Sonderdruck).

MARESCH, W.: Zur Ätiologie von plötzlichen Todesfällen im Säuglingsalter. Zschr. Kinderheilk, 84, 565 - 575 (1960).

MARESCH, W.: Plötzliche Todesfälle im Kindesalter.Schweiz. Rundschau für Med. 50, 804 (1961).

MASSHOFF, W.: Plötzlicher natürlicher Tod bei Säugling und Kind. In Ponsold: Lehrbuch der gerichtlichen Medizin. Stuttgart: G. Thieme 1957, S. 316.

v. MAYERSBACH, H.: Immunhistologische Methoden in der Histochemie. Im Handbuch der Histochemie, Herausgeber W. Graumann und K. Neumann, Stuttgart: G. Fischer
Band I Seiten 599 - 639 (1958)
Band I/2 " 188 - 268 (1966)

MERKEL, E. unnd K. WALCHER: Gerichtsärztliche Diagnostik und Technik. Leipzig 1945, S. 54, 55.

MERLER, E. and F. S. ROSEN: The gamma globulins. The structure and synthesis of the immunoglobulins. New Engl. J. Med. 275, 480 - 486, 536 - 542 (1966).

METCALF, D.: The thymic lymphocytosis stimulating factor and its relation to lymphatic leukemia. Canad. Cancer conf. 3, 351 - 366 (1959)

METCALF, D.: Reticular tumours in mice subjected to prolonged antigenic stimulation. Brit. J. Cancer 15, 769 - 799 (1961).

METCALF, D.: Leukemogenesis in AKR mice; in Tumour viruses of murine origin. Ciba Found. Symp. G.E.W.Wolstenholme and M.O'connor, eds., pp.233-261, London: Churchill 1962

METCALF, D.: The thymus and lymphopoiesis. In R.A.Good and A.E. Gabrielsen: "The thymus in immunobiology". Hoeber Medical Division, Harper & Row, NewYork-Evanston-London 1964, pp. 150 - 179.

METCALF, D. and M. ISHIDATE jr.: Periodic-Acid-Schiff-positive giant cells in the mouse thymus cortex. Nature Lond. 191, 305 (1961).

MILLER, J.F.A.P. und P. DUKOR: Die Biologie des Thymus. Akad.Verl.ges. Frankfurt 1964.

MORO, E.: Physiologische und pathologische Bedeutung des thymicolymphatischen Systems. Klin. Wschr. 9, 2185-2189 (1930).

MÜLLER, G.: Der plötzliche Kindstod. Stuttgart: G.Thieme 1963.

v. MURALT, G.: Die Immunglobuline beim Embryo, Neugeborenen und Säugling. In F. Linneweh: Fortschritte der Pädologie Bd. I, S. 31-53, Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1965.

NAIRN, R. C.: Fluorescent protein tracing. Edinburgh and London: E. & S. Livingstone Ltd. 1962.

NORD, F.F. und M. BIER: Kolloidchemische Grundlagen der Lebensmittelfrischhaltung. In Handbuch der Kältetechnik Bd. 9, S. 84, Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1952.

OUCHTERLONY, Ö.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy 5, 1-78 (1958), 6, 30-154 (1962).
OUCHTERLONY, Ö.: Gel-diffusion techniques. 15.Coll.d.Ges. f.Physiol.Chem. in Immunchemie, Herausgeber Westphal, Berlin-Heidelberg-New-York: Springer 1965 S. 13 - 35.

PALTAUF, A.: Über die Beziehungen des Thymus zum plötzlichen Tod. Wien.klin.Wschr.2, 877 (1889) zit.n.Tesseraux.

PARISH, W.E., A.M.BARRETT, R.R.A.COOMBS, M.GUNTHER, F.E. CAMPS: Hypersensitivity to milk and sudden death in infancy. Lancet 1960, 1106 - 1110

PARISH, W.E., A.M. BARRETT and R.R.A.COOMBS: Inhalation of cow's milk by sensitized guinea pigs in the conscious and an-aesthetized state. Immunology 3, 307 - 324 (1960).

PARISH, W.E., C.B. RICHARDS, N.E.FRANCE and R.R.A. COOMBS: Further investigations on the hypothesis that some cases of cot-death are due to a modified anaphylactic reaction to cow's milk. Int. Arch. Allergy 24, 215 - 243 (1964).

v. PIRQUET, C.: Allergie. Münch. med. Wschr. 53, 1457 - 1458 (1906)

PLATER, F.: Observatonium in hominis affectibus plerisque. Libri tres Basileae 1614 zit. n. Tesseraux.

POETSCHKE, G.: Grundlagen und Möglichkeiten der Anwendung fluoreszenz-markierter Antikörper. Erg.Lab.-Med. 3, 194 - 211 (1967).

REHN zit. n. Tesseraux

RENTSCH, M., E. ROSSI, G.v.MURALT und E. WIESMANN: Zur Frage der Antikörperbildung beim Neugeborenen nach peroraler Poliomyelitisimpfung. Helv.paed.Acta 16, 821 - 835 (1961).

RICHTER, M.: Plötzliche Todesfälle im Kindesalter.Verh.d. 19.Vers.f.Ges.f.Kinderheilk. Wiesbaden: J.F.Bergmann 1903, S. 63 - 73.

ROMINGER, E.: Zur Frage ungeklärter, plötzlicher Todesfälle im frühen Kindesalter. Arch.Kinderhk. 164, 209 - 214 (1961).

ROTH, N.: Zur semiquantitativen Erfassung der beiden Serum-Immunglobuline β_{2A} und β_{2M} im Neugeborenen- und Kindesalter. Ann.paediat. (Basel) 199, 548-580 (1962).

SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und R. CERNY: Zur Frage der Gefrierdenaturierung von Serumproteinen. Zschr.f.Klin.Chem. 3, 81-84 (1965).

SCHLEYER, F.: Über unerwartete Todesfälle ohne morphologischen Obduktionsbefund. Med. Klinik 60, 1225 - 1228 (1965).

SIGEL, M.: Interferon - ein neu entdecktes Abwehrsystem gegen Virusinfektionen. Umschau 66, 721 - 724 (1966).

SIWE, S.A.: Unerwarteter und plötzlicher Tod im Kindesalter in klinischer Bedeutung. Uppsala Läk.-För.Förh.39, 203 - 256 (1934).

SPAIN, D.M., V.A. BRADESS and I.J.GREENBLATT: Possible factor in sudden and unexpected death during infancy. J.Amer.med. Ass. 156, 246 - 247 (1954).

SPANN, W.: Der plötzliche Tod aus natürlicher Ursache im Säuglings- und Kleinkindesalter. Münch.Med.Wschr. 101, 929 - 933 (1959).

SORKIN, E.: On the cellular fixation of cytophilic antibody. Int. Arch. Allergy 25, 129 - 144 (1964).

STONER, R.D. and W. M. HALE: Antibody production by thymus and Peyer's patches, intraocular transplants. J. Immunol. 75, 203 - 208 (1955).

STOWENS, D.: Sudden unexpected death in infancy, observations at autopsy and a theory as to its mechanism. Amer. J. Dis. Child. 94, 674 - 681 (1957).

TESSERAUX, H.: Physiologie und Pathologie des Thymus unter besonderer Berücksichtigung der pathologischen Morphologie. 2. Auflage, Leipzig: J.A.Barth 1959.

THORBECKE, G.J. and M.W. COHEN: Immunological competence and responsiveness of the thymus. In "The Thymus" edit. by V. Defendi and D. Metcalf, The Wistar Inst.Monogr. 2, pp. 33 - 39, Philadelphia 1964.

UHLENHUTH,P. und W. SEIFFERT: Die biologische Eiweiß-differenzierung mittels der Präcipitation mit besonderer Berücksichtigung der Technik. In W. Kolle, R. Kraus, P. Uhlenhuth:Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, 3.Auflage, Band III/1 S. 365 - 468. Jena, Berlin-Wien: Fischer und Urban & Schwarzenberg 1930.

VALDES-DAPENA, M.A.: Sudden and unexpected death in infancy: A review of the world literature 1954 - 1966. Pediatr. 39, 123 - 138 (1967).

WALTER, F.: Über die Fluoreszenzmikroskopie mit markierten Proteinen. Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn. Band II, 7, 207 - 215 (1964).

WARNER, N. L. and A. SZENBERG: Immunological competence of cells from thymectomized and bursectomized chickens. zit. n. JF.A.P. Miller und P. Dukor, Die Biologie des Thymus. Akad.Verl.ges.Frankfurt/Main 1964.

WEYRICH, G.: Erfahrungen über den plötzlichen Tod aus innerer Ursache bei Kindern und Jugendlichen. Dtsch.Z. ges.gerichtl.Med. 22, 116 - 149 (1933).

WIESEL zit. n. Tesseraux

WÖCKEL, W. und W. RAUE: Zum Problem des plötzlichen Todes im Säuglingsalter und Kindesalter. Kinderärztl.Praxis 29, 291 - 304 (1961).

WOSTMAN, B.S. and H.A. GORDON: Electrophoretic studies on serum proteins of young germfree, conventional and antibiotic treated conventional chickens. Proc.Soc.exp.Biol. N.Y. 97, 832 (1958) zitiert n. v. Muralt.

Herrn Professor Dr. Gg. Schmidt danke ich herzlich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation und vor allem für seine jederzeit großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Dank schulde ich Herrn Professor Dr. R. Bader, dem Direktor des Hygiene-Institutes an der Universität Tübingen, dafür, daß ich mit seiner Unterstützung die Tierversuche in seinem Institut durchführen konnte.

Fräulein R. Käppner vom gerichtsmedizinischen Institut der Universität Tübingen gilt mein herzlicher Dank für ihre großzügige Hilfe bei der Einarbeitung in die Geldiffusionsmethoden und für die Beschaffung von Literatur.

Herr Professor Dr. F. Scheiffarth, Vorstand der Abteilung für klinische Immunologie des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg, erlaubte mir, in seinem Laboratorium die Technik der Fluoreszenzmarkierung von Proteinen kennenzulernen.

Herrn Sick, dem Pächter des Berghofes Tübingen-Lustnau, danke ich für die Bereitstellung frischer und keimarmer Kuhmilch.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft verdanke ich eine Sachbeihilfe.

Lebenslauf

Am 27. Oktober 1939 wurde ich, Ernst Rutkowski, als Sohn des Landwirts Gustav Rutkowski und seiner Ehefrau Irene in Mielau (Ostpreußen) geboren. Von 1948 bis 1954 besuchte ich die Volksschulen in Gröditz (Sachsen) und Wasseralfingen (Württemberg). Danach durchlief ich eine dreijährige kaufmännische Lehre. Im Herbst 1962 erwarb ich die Hochschulreife am Abendgymnasium für Berufstätige im Goethe-Gymnasium in Frankfurt am Main.

Das Medizinstudium begann ich im Winter 1962 in Frankfurt am Main; dort legte ich 1963 die naturwissenschaftliche und 1965 die ärztliche Vorprüfung ab. Im Sommersemester 1966 setzte ich mein klinisches Studium an der Universität in Tübingen fort; Ende Februar 1969 bestand ich dort die ärztliche Prüfung.